



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica

Dissertação de Mestrado

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FASE ESTACIONÁRIA
REVERSA FENIL-PROPIL-METIL-SILOXANO, IMOBILIZADA
POR MICRO-ONDAS, PARA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA

Fernanda Ribeiro Begnini

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

CAMPINAS

2011

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

B394p Begnini, Fernanda Ribeiro.
Preparação e caracterização de fase estacionária reversa fenil-propil-metil-siloxano, immobilizada por micro-ondas, para cromatografia líquida de alta eficiência / Fernanda Ribeiro Begnini. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fases estacionárias reversas. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Poli (2-fenilpropil) metilsiloxano. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation and characterization of microwave-immobilized phenyl-propyl-methyl-siloxane stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography

Palavras-chaves em inglês: Reversed-phase high-performance liquid chromatography, Stationary phases, Poly (2-phenylpropyl) methylsiloxane

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP), Dra. Rosely Barbosa Silva (LANAGRO/SP)

Data de defesa: 01/08/2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Silvia e José Carlos, que muito contribuíram para meu sucesso e me forneceram a base indispensável para uma vida maravilhosa. Também dedico este trabalho aos meus irmãos Gui, Fábio, Nita e Mar, e ao meu noivo Alexandre, pela incomparável compreensão, paciência, apoio, carinho e amor. Por fim, dedico a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

"Around here, however, we don't look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we're curious, and curiosity keeps leading us down new paths." (Walt Disney)

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia... Pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante." (Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À vida, por me fornecer desafios engrandecedores.

À Profa. Dra. Isabel Jardim, pela oportunidade, apoio, dedicação, confiança e exemplos de orientação e profissionalismo.

À todos os amigos do LabCrom e da UNICAMP, Marcelo, Milena, Liane, Renata M., Renata N., Carla, Elias, Karen, Daniele, Elisa, Marcel, Lais, Louise, Gizelle, Rafael, Fernanda Sales, Lucília e Priscila, pela grande amizade, companheirismo e auxílio nos trabalhos.

À toda minha família, pais, irmãos, tios, primos e avós, pelo amor, apoio e compreensão incomparáveis, principalmente nos momentos em que estive ausente.

À todos meus amigos, pelo carinho, companhia e lealdade. Em especial, ao Harry, Raquel, Renata, Glauco, Simone, Priscila, Nozômi, Michelin, Vareta, Felipe, Thaís, Mariana, Michele, Janaina, Sâmara e Aline V., pela imensa amizade, até mesmo à distância.

Ao Alexandre, meu grande amor, pela compreensão, amizade e imenso apoio em todos os momentos de minha vida, e em especial por sempre ter me auxiliado durante todo meu mestrado.

À todos meus colegas do IPT que muito me ensinaram e sempre me apoiaram nos momentos de dificuldade.

À toda comunidade do Instituto de Química da UNICAMP, professores, funcionários e alunos, pelos indispensáveis ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e confiança no trabalho.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (BACHARELADO) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara, SP, Brasil. Período: 03/2005 a 12/2008.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA: Título Monografia: “Caracterização de fármacos policristalinos pelo Método de Rietveld com dados de difração de raios X: Análise quantitativa de fases dos polimorfos da carbamazepina”. Orientação: Prof. Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Período: 10/2006 a 12/2008.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

MONITORA DA DISCIPLINA “QUÍMICA FUNDAMENTAL” – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 03/2006 a 07/2006.

MONITORA DOS MINI-CURSOS “CRISTALOGRAFIA BÁSICA” E “MÉTODO DE RIETVELD” - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 02/2008.

MEMBRO DA EMPRODEQUI JR – Empresa de Projetos e Consultoria em Química (Empresa Júnior do IQ/UNESP) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Período: 03/2005 a 06/2008.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (IPT) – Laboratório de Análises Químicas do Centro de Metrologia em Química, São Paulo, SP, Brasil. Função: Assistente de Pesquisa Trainee. Período: 06/2009 a 07/2010.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 08

ARTIGOS CIENTÍFICOS

ANTONIO, S. G.; **BENINI, F. R.**; FERREIRA, F. F.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. O. P. Synchrotron X-ray powder diffraction data of atorvastatin. Powder Diffraction, v. 23, n. 4, p. 350-355, 2008. (DOI 10.1154/1.2996511).

ANTONIO, S. G.; **BENINI, F. R.**; FERREIRA, F. F.; ROSA, P. C. P.; SANTOS, C. O. P. Quantitative phase analyses through the Rietveld method with X-ray powder diffraction data of heat-treated carbamazepine form III. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100, n. 7, p. 2658-2664, 2011. (DOI 10.1002/jps.22482).

PRÊMIO

PRÊMIO LAVOISIER, por Honra ao Mérito, concedido pelo Conselho Regional de Química da IV Região (CRQ-IV), por ser classificada como melhor aluna do curso de Bacharelado em Química da Turma de 2008 do Instituto de Química da UNESP Campus Araraquara.

RESUMO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FASE ESTACIONÁRIA REVERSA FENIL-PROPIL-METIL-SILOXANO, IMOBILIZADA POR MICRO-ONDAS, PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. Novas fases estacionárias (FE) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-FR) foram preparadas a partir da sorção e imobilização por micro-ondas do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PPFMS) sobre suporte de sílica Kromasil (tipo B, esférica, 5 μ m). A FE preparada com carga do copolímero de 50%, imobilizada a 540 W por 80 minutos e extraída com clorofórmio (3 horas) e metanol (2 horas) após 8 dias de imobilização, apresentou desempenho cromatográfico satisfatório, com eficiências acima de 60000 pratos/m e parâmetros cromatográficos na faixa aceita pela literatura. Através da caracterização físico-química da FE preparada, pelas técnicas de RMN ^{29}Si e ^{13}C , e espectroscopia de absorção no infravermelho, entre outras, foi possível sugerir que o PPFMS encontra-se fisicamente sorvido e quimicamente ligado à sílica. A caracterização cromatográfica mostrou que a FE possui seletividade hidrofóbica, seletividade estérica, pouca interação com analitos polares e grupos silanóis residuais, sendo características apropriadas para uma FR. A FE preparada apresenta grande potencial na separação de agrotóxicos, fármacos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, além de possuir estabilidade em meio ácido.

Palavras-chaves: Fases estacionárias reversas; cromatografia líquida de alta eficiência; poli(2-fenilpropil)metilsiloxano.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MICROWAVE-IMMOBILIZED PHENYL-PROPYL-METHYL-SILOXANE STATIONARY PHASES FOR REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. A new stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was prepared by sorption and microwave immobilization of the copolymer poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane (PPPMS) onto a silica support (Kromasil[®], type B, 5 μ m). The stationary phase prepared with copolymeric content of 50%, immobilized at 540 W for 80 min and extracted with chloroform (3 hours) and methanol (2 hours) eight days after immobilization, showed satisfactory chromatographic performance, with efficiency above 60000 plates/m and symmetrical peaks. The physical–chemical characterization of the new microwave immobilized stationary phase using solid-state NMR spectroscopy and infrared spectroscopy suggested that the copolymer is physically sorbed and chemically bonded onto the silica support. The chromatographic characterization showed that the stationary phase has hydrophobic selectivity, steric selectivity, low interaction with polar analytes and residual silanols, suggesting that the stationary phase prepared is promising to be used in RP-HPLC. The microwave immobilized stationary phase presented chemical stability and potential applicability to separation of pesticides, pharmaceutical drugs and polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords: reversed-phase high-performance liquid chromatography; stationary phases; poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	1
1.2 Suportes cromatográficos	3
1.2.1 Sílica	4
1.2.2 Suportes cromatográficos poliméricos	6
1.2.3 Óxidos metálicos	7
1.2.4 Óxidos mistos	8
1.3 Fases estacionárias para CLAE-FR	8
1.3.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas	9
1.3.2 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados	11
1.3.3 Fases estacionárias fenil	13
1.4 Radiação micro-ondas	17
1.5 Avaliação das colunas cromatográficas	20
2 OBJETIVOS	25
3 PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1 Reagentes	26
3.2 Colunas cromatográficas comerciais	27
3.3 Equipamentos	28
3.4 Suporte cromatográfico	29
3.5 Fase estacionária líquida	29
3.6 Colunas cromatográficas	29
3.7 Preparação das fases estacionárias	31
3.7.1 Sorção da fase líquida ao suporte cromatográfico	31
3.7.2 Imobilização do copolímero ao suporte cromatográfico	33
3.7.3 Extração do excesso do copolímero	34
3.8 Caracterização físico-química da FE líquida, suporte cromatográfico e fases estacionárias	34

3.8.1	Difratometria de raios X	35
3.8.2	Análise elementar	35
3.8.3	Análise termogravimétrica	36
3.8.4	Área superficial específica, volume e diâmetro de poros.....	36
3.8.5	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si e ^{13}C	37
3.8.6	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	39
3.9	Enchimento das colunas cromatográficas	40
3.9.1	Suspensão da fase estacionária	40
3.9.2	Recheio das colunas com a fase estacionária	41
3.10	Preparo das fases móveis.....	43
3.11	Condicionamento das colunas	43
3.12	Caracterização cromatográfica das fases sorvidas e imobilizadas	44
3.13	Avaliação cromatográfica da fase estacionária otimizada.....	45
3.13.1	Mistura teste de Engelhardt e Jungheim	45
3.13.2	Misturas teste de Szabó e Csató.....	46
3.13.3	Mistura teste de Neue	47
3.13.4	Misturas teste de Tanaka	48
3.14	Avaliação da aplicabilidade das fases estacionárias e comparação com colunas comerciais	51
3.14.1	Separação de agrotóxicos.....	51
3.14.2	Separação de fármacos	52
3.14.3	Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	54
3.15	Avaliação da estabilidade química da FE otimizada	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Caracterização físico-química do suporte cromatográfico	57
4.1.1	Caracterização por difratometria de raios X.....	57
4.1.2	Espectroscopia de absorção no infravermelho	57
4.1.3	Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros	58
4.1.4	Caracterização por RMN de ^{29}Si	59
4.1.5	Caracterização por termogravimetria	60
4.2	Caracterização físico-química da fase estacionária líquida	61
4.2.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho	61
4.2.2	Termogravimetria.....	62
4.3	Preparação das fases estacionárias.....	63
4.3.1	Estudo da sorção do copolímero sobre a sílica	63
4.3.2	Imobilização das fases estacionárias.....	66

4.3.3	Estudo das condições de otimização da imobilização por micro-ondas ...	68
4.4	Otimização da composição da fase móvel e da vazão de análise.....	73
4.5	Otimização do tempo de repouso entre a imobilização e a extração	74
4.6	Repetibilidade do enchimento	76
4.7	Caracterização físico-química das fases estacionárias	77
4.7.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho	77
4.7.2	Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros	78
4.7.3	Espectroscopia de RMN ²⁹ Si e ¹³ C	79
4.8	Avaliação cromatográfica da FE imobilizada a 540 W por 80 min.....	81
4.8.1	Mistura teste de Engelhardt e Jungheim.....	81
4.8.2	Misturas teste de Szabó e Csató	82
4.8.3	Mistura teste de Neue.....	84
4.8.4	Misturas teste de Tanaka.....	85
4.9	Comparação da FE Si-PFPMS com outras fases preparadas no LabCrom	88
4.10	Avaliação da aplicabilidade da FE imobilizada a 540 W por 80 min e comparação com colunas comerciais.....	91
4.10.1	Separação de agrotóxicos.....	91
4.10.2	Separação de fármacos	92
4.10.3	Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	95
4.11	Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias.....	97
5	CONCLUSÕES.....	102
6	REFERÊNCIAS	103

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico.

As₁₀: fator de assimetria do pico a 10% de sua altura.

BET: método de Brunauer, Emmett e Teller.

BJH: método de Barret, Joyner e Hallenda.

CCP: carga copolimérica.

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

CP/MAS: polarização cruzada segundo rotação em ângulo mágico.

$d_{\text{copolímero}}$: densidade do copolímero utilizado como fase estacionária líquida.

DSC: calorimetria diferencial de varredura.

DTA: análise térmica diferencial.

DTG: termogravimetria derivada.

F: vazão da fase móvel.

FE: fase estacionária.

Fi: valor do fator de interesse de um planejamento.

FM: fase móvel.

F_{ponto central}: valor do fator de interesse no ponto central de um planejamento.

FR: fase reversa.

F_{variação}: valor de variação do fator de interesse de um planejamento.

H: altura de prato.

HMDS: hexametildissilazano.

HPA: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

HPLC: high-performance liquid chromatography.

IV: espectroscopia na região do infravermelho.

k: fator de retenção.

L: comprimento da coluna cromatográfica.

LabCrom: laboratório de pesquisas em cromatografia líquida do Instituto de Química da Unicamp.

$\bar{m}_{\text{copolímero}}$: quantidade necessária de copolímero para preencher os poros da sílica.

MO: radiação micro-ondas.

MT: mistura teste.

N: número de pratos.

p.a.: padrão analítico.

PBD: polibutadieno.

PDMS: poli(dimetilsiloxano).

PFPMMS: poli(2-fenilpropil)metilsiloxano.

PMOS: poli(metiloctilsiloxano).

PMPS: poli(metilfenilsiloxano).

PMTDS: poli(metiltetradecilsiloxano).

PS-DVB: poliestireno divinilbenzeno.

RD-IV: refletância difusa no infravermelho.

RMN: ressonância magnética nuclear.

Rs: resolução entre picos.

Si(PFPMS): fase estacionária baseada na imobilização do PFPMS sobre partículas de sílica nua.

t'_R : tempo de retenção ajustado.

TFA: ácido trifluoracético.

TFM: copolímero de tetrafluoretileno e perflúor(propil vinil éter).

TG: termogravimetria.

t_M : tempo de retenção de um componente não retido pela FE ou tempo de retardamento.

TMCS: trimetilclorossilano.

t_R : tempo de retenção do soluto.

TT: tratamento térmico.

UV-Vis: região do espectro eletromagnético que compreende as radiações ultravioleta e luz visível.

V_{col} : volume de coluna.

$V_{poro SiO_2}$: volume médio de poros da sílica.

w_b : largura de um pico na linha de base.

w_h : largura de um pico a meia altura.

X_n : valor codificado de um planejamento experimental.

μ : velocidade linear da fase móvel.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros cromatográficos obtidos para as fases estacionárias com diferentes CCP.....	65
Tabela 2: Parâmetros cromatográficos obtidos para as fases estacionárias imobilizadas com CCP 50%, em diferentes condições de imobilização.	66
Tabela 3: Parâmetros cromatográficos obtidos na determinação das condições ótimas de imobilização.	69
Tabela 4: Parâmetros cromatográficos obtidos na otimização das condições de imobilização.	71
Tabela 5: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se diferentes composições de fase móvel MeOH:H ₂ O.....	73
Tabela 6: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, após diferentes dias de repouso entre a etapa de imobilização e extração, assim como as porcentagens de carbono obtidas para as fases.....	75
Tabela 7: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 620 W por 80 minutos, com a MT-1, a fim de avaliar a variação decorrente do enchimento das colunas cromatográficas.	76
Tabela 8: Valores de área superficial, volume e diâmetro de poros das fases estacionárias sorvidas a diferentes cargas copoliméricas e da FE imobilizada a 540 W por 80 min, obtidos pelas técnicas de BET e BJH.	78
Tabela 9: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se a mistura teste de Engelhardt e Jungheim.....	82
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se as misturas teste A e B de Szabó e Csató.....	83
Tabela 11: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se a mistura teste de Neue.....	84

Tabela 12: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se as misturas teste A, B, C e D de Tanaka.	87
Tabela 13: Comparação da FE preparada com o copolímero PFPMS, com outras fases estacionárias preparadas no LabCrom, utilizando-se diferentes polímeros, suporte cromatográficos e tipos de imobilização.....	89
Tabela 14: Porcentagem de carbono obtidas para a FE sorvida a 50% e para a FE imobilizada a 540 W por 80 min, determinadas antes e após as fases serem submetidas à condições drásticas de análise em meio básico e ácido.....	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática dos componentes básicos de um cromatógrafo a líquido: (a) reservatório de fase móvel; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna cromatográfica; (e) detector e (f) sistema de aquisição de dados. 1
- Figura 2:** Representação esquemática dos tipos de grupos silanóis e ligações siloxanos presentes na superfície da sílica. 4
- Figura 3:** Representação da equação química da reação de formação do poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno (PS-DVB). 7
- Figura 4:** Representação da estrutura de uma fase estacionária estericamente protegida, com grupos isobutil ligados diretamente ao átomo de silício e uma cadeia alquila C18¹⁹. 10
- Figura 5:** Representação de uma fase estacionária com grupo polar embutido¹⁵. 10
- Figura 6:** Representação da estrutura da fase estacionária bidentada contendo cadeia alquila C18 e átomos de silício interligados por um grupo propil. 11
- Figura 7:** Representação dos tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico: (A) recobrimento das paredes dos poros e (B) preenchimento do volume dos poros. 12
- Figura 8:** Representação esquemática da estrutura das fases estacionárias fenil: sílica é o suporte cromatográfico; espaçador é uma cadeia alquila de 0 a 6 átomos de carbono; X é um heteroátomo ou um grupo -CH₂; grupo fenil corresponde a 1 ou 2 anéis aromáticos e a tecnologia de ligação pode ser polimérica (R = OH ou Si-O-Si) ou monomérica (R = metil ou isopropil). 14
- Figura 9:** Representação dos estudos conformacionais que indicam a orientação do grupo fenil frente à superfície da sílica, com diferentes espaçadores: (A) grupo etil; (B) grupo propil ligado à superfície da sílica. 15
- Figura 10:** Representação da estrutura do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMMS). 17

Figura 11: Representação do espectro eletromagnético e da localização das radiações micro-ondas.	17
Figura 12: Representação esquemática das diferentes formas de aquecimento: (A) aquecimento convencional, por condução e convecção e (B) aquecimento por micro-ondas.	18
Figura 13: Representação de um instrumento de micro-ondas, com bombas de digestão fixadas em um rotor, sob a ação de micro-ondas, geradas no magnetron e homogeneamente espalhadas por um refletor rotatório.	20
Figura 14: Representação de um cromatograma típico da separação de uma mistura de dois componentes.	20
Figura 15: Representação esquemática para determinação do fator de assimetria.	23
Figura 16: Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.	24
Figura 17: Representação esquemática do sistema utilizada para realização do polimento das paredes internas das colunas cromatográficas.	31
Figura 18: Representação esquemática da coluna cromatográfica e seus acessórios: (a) porcas terminais; (b) redutores de fluxo; (c) mangas com filtro retentor e (d) corpo da coluna.	31
Figura 19: Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies de silício por RMN ^{29}Si	38
Figura 20: Representação dos diferentes modos de vibração das moléculas, quando submetidas à radiação infravermelho.	39
Figura 21: Representação esquemática do sistema de enchimento das colunas.	41
Figura 22: Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes: (A) MT-1: uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; e (B) MT-2: uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno.	44
Figura 23: Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste de Engelhardt e Jungheim.	46

- Figura 24:** Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes de Szabó e Csató: (A) MT A: uracila, fenol, m-cresol, acetofenona, benzoato de metila, tolueno, p-xileno e propilbenzeno; (B) MT B: uracila, benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno e butilbenzeno.47
- Figura 25:** Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste de Neue e colaboradores.48
- Figura 26:** Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes de Tanaka: (A) MT A: uracila, butilbenzeno, trifenileno, o-terfenila e pentilbenzeno; (B) MT B: uracila, fenol e cafeína; e (C) MT C e MT D: uracila, fenol e benzilamina.49
- Figura 27:** Estruturas químicas dos agrotóxicos estudados: imazaquim, cianazina, atrazina, diurom e linurom.....52
- Figura 28:** Estruturas químicas dos fármacos estudados na MT F1: AAS, paracetamol e cafeína.52
- Figura 29:** Estruturas químicas dos fármacos estudados na MT F2: levofloxacina, bromidrato de dextrometorfano, diazepam, hidrocloreto de amitriptilina, hidrocloreto de nortriptilina.....53
- Figura 30:** Representação das estruturas químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados: naftaleno, acenaftileno, bifenil, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e trifenileno, assim como a do benzeno.54
- Figura 31:** Difratoograma da sílica porosa Kromasil®, obtido com a utilização de suporte plano de silício.57
- Figura 32:** Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amostra de sílica nua Kromasil®, utilizando-se o método de pastilha de KBr.58
- Figura 33:** Espectro de RMN de ²⁹Si para a SiO₂ pura.....59
- Figura 34:** Termogramas obtidos para a sílica nua em: (A) atmosfera oxidante; e (B) atmosfera inerte.60
- Figura 35:** Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amostra do copolímero PFPMS, utilizando-se o método de transmissão, com janela de NaCl. 61
- Figura 36:** Termogramas obtidos para o copolímero PFPMS em: (A) atmosfera oxidante; e (B) atmosfera inerte.63

- Figura 37:** Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias sorvidas com diferentes cargas copoliméricas, em diferentes composições de FM MeOH:H₂O, utilizando-se as MT-1 e MT-2: (A) FE com CCP de 40%; (B) FE com CCP de 50%; e (C) FE com CCP de 55%. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.64
- Figura 38:** Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias, com CCP de 50%, em diferentes condições de imobilização por micro-ondas e composições de FM MeOH:H₂O, utilizando-se a MT-1 e a MT-2: (A) FE imobilizada a 520 W por 90 min; (B) FE imobilizada a 620 W por 80 min; e (C) FE imobilizada a 720 W por 70 min. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....67
- Figura 39:** Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias imobilizadas a diferentes condições de temperatura e tempo, utilizando-se a MT-1. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40, vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.70
- Figura 40:** Cromatogramas obtidos nas análises das fases imobilizadas a diferentes condições de potência e tempo de 80 minutos, utilizando-se as misturas teste: (A) MT-1 e (B) MT-2. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....72
- Figura 41:** Representação da curva de van Deemter, para a FE imobilizada a 540 W / 80 min.74

- Figura 42:** Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias preparadas com diferentes tempos de repouso entre a imobilização e a extração, utilizando-se: (A): MT-1 e (B): MT-2. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.75
- Figura 43:** Espectros de absorção no infravermelho obtidos para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos através das técnicas: (A) pastilha de KBr; (B) refletância difusa.....77
- Figura 44:** Espectro de RMN de ²⁹Si para a fase estacionária imobilizada a 540 W por 80 minutos.....79
- Figura 45:** Espectro de RMN de ¹³C para a fase estacionária imobilizada a 540 W por 80 minutos.....80
- Figura 46:** Cromatograma obtido na análise da mistura teste de Engelhardt e Jungheim, empregando-se a FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v); volume de injeção: 5 µL; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) anilina, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno e (*) impureza.81
- Figura 47:** Cromatogramas obtidos nas análises das misturas teste A e B de Szabó e Csató com a FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos. (A) MT A, com FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v); (B) MT B, com FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (A): (1) uracila, (2) fenol, (3) m-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) p-xileno e (8) propilbenzeno; (B): (1) uracila, (2) benzeno, (3) tolueno, (4) etilbenzeno, (5) propilbenzeno, (6) butilbenzeno.83

Figura 48: Cromatograma obtido na análise da mistura teste de Neue com a FE imobilizada a 540 W por 80 min. Condições cromatográficas: FM MeOH:20 mmol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,0, 65:35 (v/v), volume de injeção: 5 μ L; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) butilparabeno, (3) dipropilftalato, (4) naftaleno, (5) acenafteno, (6) propranolol e (7) amitriptilina.84

Figura 49: Cromatogramas obtidos nas análises das misturas teste de Tanaka com a FE imobilizada a 540 W por 80 min: (A) MT A, com FM MeOH:H₂O 80:20 (v/v); (B) MT B, com FM MeOH:H₂O 30:70 (v/v); (C) MT C, com FM MeOH:20 mmol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,6, 30:70 (v/v) e (D) MT D, com FM MeOH:20 mmol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 2,7, 30:70 (v/v). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (A): (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) trifenileno, (4) o-terfenila e (5) pentilbenzeno; (B): (1) uracila, (2) fenol, (3) cafeína; (C): (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas; (D): (1) uracila, (2) benzilamina e (3) fenol.86

Figura 50: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de agrotóxicos, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®]. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), volume de injeção: 5 μ L; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) imazaquim, (2) cianazina, (3) atrazina, (4) diurom e (5) linurom.91

Figura 51: Cromatogramas obtidos com a FE 540 W por 80 min, com a coluna C18 Nova Pak[®] e a coluna Fenil-Hexil Zorbax[®] nas análises de misturas de fármacos: (A) padrões AAS, paracetamol, cafeína; e (B) medicamento comercial. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), volume de injeção: 5 μ L; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) ácido acetilsalicílico, (2) paracetamol e (3) cafeína.93

Figura 52: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de fármacos MT F2, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®]. Condições cromatográficas: FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 2,7 (50:50 v/v), volume de injeção: 5 µL; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfano, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina, (5) diazepam e (*) impurezas.....94

Figura 53: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de HPA, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®]. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v) e vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v) e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; volume de injeção: 5 µL; detecção UV-Vis a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) benzeno, (2) naftaleno, (3) acenaftileno, (4) bifenil, (5) fluoreno, (6) fenantreno, (7) antraceno, (8) fluoranteno, (9) pireno e (10) trifenileno.....96

Figura 54: Avaliação da estabilidade química, em meio alcalino, das colunas cromatográficas recheadas com a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e com a FE sorvida com carga copolimérica de 50%, em termos da (A) eficiência, (B) fator de assimetria a 10% da altura do pico e (C) fator de retenção do composto naftaleno, presente na MT-2. Condições cromatográficas: FM MeOH:50 mmol/L K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm.....98

Figura 55: Avaliação da estabilidade química, em meio ácido, das colunas cromatográficas recheadas com a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e com a FE sorvida com carga copolimérica de 50%, em termos da (A) eficiência, (B) fator de assimetria a 10% da altura do pico e (C) fator de retenção do composto tolueno, presente na MT-1. Condições cromatográficas: FM MeOH:0,1% ácido trifluoracético pH 1,7 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm. 100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química de separação amplamente utilizada para fins qualitativos e quantitativos, no qual os componentes de uma mistura são separados, através de suas distribuições entre duas fases: uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel líquida (FM) que flui através da FE, com o auxílio de bombas de alta pressão^{1,2,3}.

As separações são realizadas utilizando-se cromatógrafos a líquido, modulares ou integrados, que são constituídos, basicamente, pelos seguintes componentes: reservatório de FM, bomba de alta pressão com controlador de pressão, sistema de injeção de amostra, coluna cromatográfica, detector e sistema de registro e tratamento de dados. Os sistemas também podem possuir fornos termostatizados que englobam o injetor, a coluna cromatográfica e o detector, permitindo o controle térmico e a realização de análises a diferentes temperaturas.

A Figura 1 representa esquematicamente os componentes básicos de um cromatógrafo a líquido⁴.

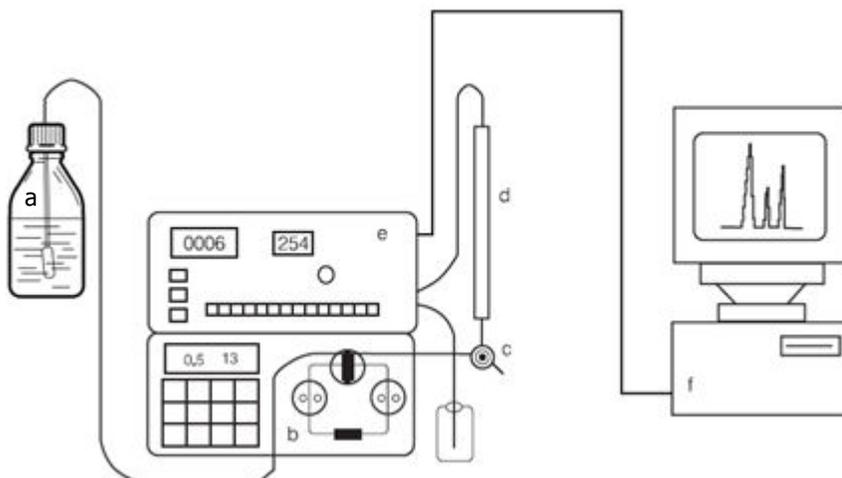


Figura 1: Representação esquemática dos componentes básicos de um cromatógrafo a líquido: (a) reservatório de fase móvel; (b) bomba de alta pressão; (c) válvula de injeção; (d) coluna cromatográfica; (e) detector e (f) sistema de aquisição de dados.

As principais vantagens da CLAE estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa detectabilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, além de fornecer resultados em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade^{1,5}.

Apesar das inúmeras vantagens, a CLAE, assim como as demais técnicas cromatográficas, apresenta algumas limitações, como por exemplo, o custo elevado da instrumentação e da sua manutenção, e o fato de não ser capaz de fornecer informações que permitam a identificação definitiva dos picos, a menos que um detector qualitativo especial¹, como o espectrômetro de massas, seja utilizado.

O desenvolvimento contínuo e a disponibilidade de cromatógrafos a líquido e de fases estacionárias de alta qualidade têm propiciado o crescimento substancial das pesquisas e das aplicações da CLAE⁶.

Atualmente, a CLAE tem sido utilizada em diferentes áreas de pesquisa, como química ambiental, alimentos, fármacos, agrotóxicos, polímeros, entre outras. E, dentre os inúmeros estudos na área, a busca por novas fases estacionárias é intensa, uma vez que a coluna é um dos principais componentes do sistema cromatográfico e está diretamente relacionada com a eficiência e a seletividade da separação.

Entre os diferentes modos disponíveis de separação por CLAE, em fase normal, em fase reversa, troca iônica e outros, a cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR) é a mais utilizada, sendo que aproximadamente de 80% a 90% das separações por cromatografia líquida são realizadas nesta modalidade⁶.

Basicamente, a CLAE-FR utiliza fase estacionária de menor polaridade (mais apolar) e uma fase móvel de maior polaridade (fases móveis aquosas, contendo diferentes proporções de modificadores orgânicos miscíveis). As fases estacionárias reversas apresentam inúmeras vantagens, como, o uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, rápido equilíbrio da coluna cromatográfica após mudança da fase móvel, facilidade de emprego da eluição por gradiente, boa repetibilidade dos tempos de retenção, maior velocidade de análise e amplo campo de atuação, devido à possibilidade de separação de compostos com diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas⁵.

O aumento da estabilidade química, a redução da alta atividade de grupos residuais e a seletividade diversificada têm sido, nas últimas quatro décadas, os principais focos de pesquisas na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR. Novas e eficientes estratégias de modificação da superfície da sílica e a introdução de novos materiais como suportes cromatográficos têm minimizado estas limitações e possibilitado uma crescente popularização da CLAE-FR⁷.

1.2 Suportes cromatográficos

As fases estacionárias reversas são comumente constituídas de espécies orgânicas (apolares e hidrofóbicas) sorvidas, imobilizadas ou quimicamente ligadas ao suporte cromatográfico⁸.

Idealmente, o material empregado como suporte cromatográfico deve apresentar características como: ser suficientemente poroso, possibilitando a absorção do líquido no interior dos poros; possibilitar a rápida taxa de transferência de massa e fixação adequada do líquido estacionário; apresentar elevada concentração de grupos ativos em sua superfície, facilitando sua modificação química a partir da adsorção ou reação de fixação do líquido estacionário; suas partículas devem ser obtidas em uma faixa estreita de distribuição de tamanhos e apresentarem elevada área superficial, proporcionando alta capacidade de aceitação de amostra; apresentar estabilidades térmica, mecânica e química elevadas^{2,9,10}, sendo inertes quimicamente para não reagirem com os componentes da amostra.

O suporte cromatográfico mais comumente utilizado em cromatografia líquida em fase reversa é a sílica. Outros suportes também utilizados, mas em menor proporção, são os óxidos inorgânicos, como a alumina, a titânia e a zircônia, e diferentes polímeros orgânicos.

Cada tipo de suporte cromatográfico apresenta vantagens e desvantagens e, a escolha de um determinado material é orientada pelas necessidades da separação desejada, uma vez que ainda não foi encontrado um material que apresente todas as características desejáveis para um suporte⁵.

1.2.1 Sílica

Por mais de 40 anos, a sílica tem sido o material preferido para a preparação das fases estacionárias para CLAE-FR, sendo que é mecanicamente estável a altas pressões; possui elevada estabilidade térmica e química; pode ser facilmente modificada por possuir elevado número de grupos silanóis em sua superfície; e é comercialmente disponível em uma grande variedade de tamanho de partículas, de poros e formas, além de conferir melhor eficiência, comparada a outros suportes cromatográficos^{2,5}. Atualmente, mais de 90% das fases estacionárias utilizadas em CLAE são à base de sílica porosa e esférica¹¹.

O conhecimento da estrutura e da superfície da sílica utilizada como suporte cromatográfico é de fundamental importância para a interpretação de suas propriedades. A sílica utilizada como suporte cromatográfico é de natureza amorfa (material não cristalino, não possuindo padrão de difração de raios X definido) e consiste em uma rede de grupos silanóis, alguns dos quais podem formar grupos siloxano ou ligações de hidrogênio entre si ou com a água^{5,6}.

A sílica amorfa, com estrutura porosa, possui três diferentes tipos de grupos silanóis em sua superfície, sendo estes os silanóis isolados, geminais e vicinais, além de possuir ligações de grupos siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). Os grupos silanóis são considerados fortes sítios de absorção hidrofílicos (tornam-se o centro de adsorção em cromatografia de fase normal), enquanto que os grupos siloxanos são hidrofóbicos, retendo moléculas apolares em seus sítios⁵. A Figura 2 representa os diferentes tipos de grupos silanóis e os grupos siloxanos presentes na superfície da sílica².

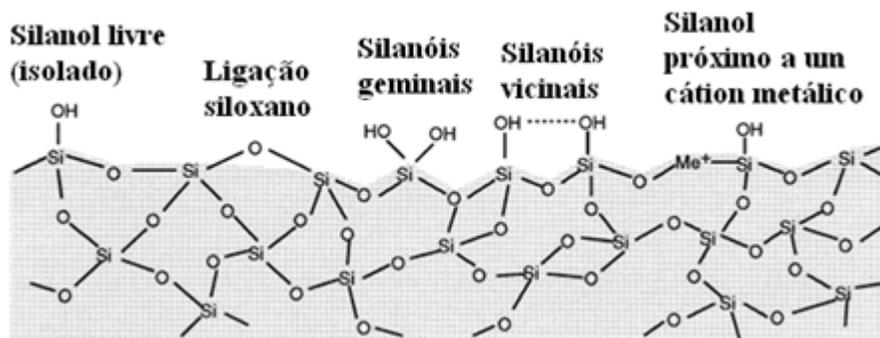


Figura 2: Representação esquemática dos tipos de grupos silanóis e ligações siloxanos presentes na superfície da sílica.

Como pode ser observado na Figura 2, os átomos de silício expostos na superfície da sílica mantêm coordenação tetraédrica com o oxigênio, ligando-se ao oxigênio de grupos hidroxilas, formando-se grupos silanóis, ou a outro átomo de silício, formando-se as ligações siloxanos¹².

A presença de diferentes tipos de grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) na superfície da sílica, tornando-a não homogênea, constitui em um aspecto limitante na utilização deste suporte em cromatografia, uma vez que estes grupos afetam a funcionalização e, conseqüentemente, o mecanismo de retenção. Os silanóis são ácidos e podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas básicas e adsorvê-las, resultando em picos assimétricos, que são difíceis de serem tratados quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferirem nos picos de outros solutos que eluem em tempos de retenção similares. A adsorção de compostos básicos pode, muitas vezes, ser irreversível, bloqueando os sítios de interação e afetando o desempenho cromatográfico, ocasionando até mesmo a deterioração da coluna⁵.

Embora a presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica seja indesejável em alguns aspectos, tem-se que estes grupos são indispensáveis para a modificação da superfície do suporte, uma vez que atuam como sítios reacionais. Também, a presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica faz com que haja diferentes mecanismos de retenção dos solutos na FE, uma vez que estes grupos podem atuar como sítios de troca iônica, além de haver interações de natureza hidrofóbica, favorecendo a separação de diferentes misturas que possuam analitos ionizáveis, isômeros, entre outros^{13,14}.

Outro aspecto limitante relacionado com a utilização da sílica como suporte cromatográfico, assim como suas colunas derivadas, é a sua instabilidade frente a fases móveis ácidas e básicas, sendo estável apenas na faixa de pH entre 2 e 8. Em soluções ácidas ocorre a hidrólise das ligações siloxanos⁶, causando a perda da fase estacionária e, em soluções básicas há a dissolução da sílica, ocasionando o colapso da estrutura do leito da coluna⁵.

Impurezas metálicas, como por exemplo, ferro, sódio, cálcio, alumínio, entre outros, podem representar de 0,1% a 0,3% em massa de peso da sílica. O grande inconveniente da presença de traços metálicos na sílica é o aumento da acidez dos

grupos silanóis próximos aos átomos metálicos. Estima-se que a acidez desses grupos aumenta de tal forma que eles interagem cerca de 50 vezes mais fortemente com os compostos em análise que os grupos silanóis que não possuem impurezas metálicas em suas adjacências. Esse comportamento pode gerar alargamento da banda cromatográfica, principalmente para compostos básicos e perda de resolução e eficiência¹⁵.

A diminuição da quantidade de metais presentes na sílica, em muitos casos, é realizada através de tratamentos com ácidos. A denominação de sílica de alta pureza ou sílica do tipo B, é empregada para partículas de sílica com baixo teor de metais, havendo alumínio e ferro abaixo de 3 µg/g e teor de titânio, zircônio e zinco em quantidades não detectáveis pela técnica de absorção atômica^{3,15}.

Em função das limitações do uso da sílica como suporte cromatográfico, muitos estudos vêm sendo realizados para tentar melhorar a estabilidade da sílica em condições extremas de pH e minimizar a presença de silanóis ácidos em sua superfície^{5,9,16}. Uma possibilidade é a modificação da sua superfície, aproveitando suas propriedades favoráveis, como rigidez e repetibilidade de tamanho de poro e de partícula ou, em alguns casos, há a possibilidade de substituição da sílica por outros suportes, como por exemplo, diferentes polímeros e alguns óxidos inorgânicos, que também apresentam determinadas desvantagens¹⁶.

1.2.2 Suportes cromatográficos poliméricos

Os suportes de origem polimérica⁸, de natureza hidrofóbica, são muito utilizados para a separação de moléculas orgânicas, peptídeos e proteínas. O polímero desta natureza mais utilizado é o poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno (PS-DVB), altamente hidrofóbico, sendo constituído por partículas esféricas e estrutura porosa. A Figura 3 representa a estrutura do PS-DVB.

A principal vantagem destes suportes é seu emprego em meios altamente básicos, uma vez que a estrutura polimérica é quimicamente estável em pH na faixa de 1 a 13. Em termos de retenção dos compostos, os analitos aromáticos são fortemente retidos, em virtude das interações π - π entre o suporte, altamente hidrofóbico, e os analitos. No entanto, o uso deste material provoca o alargamento dos picos

cromatográficos, uma vez que o fluxo da fase móvel sobre o material polimérico não é homogêneo.

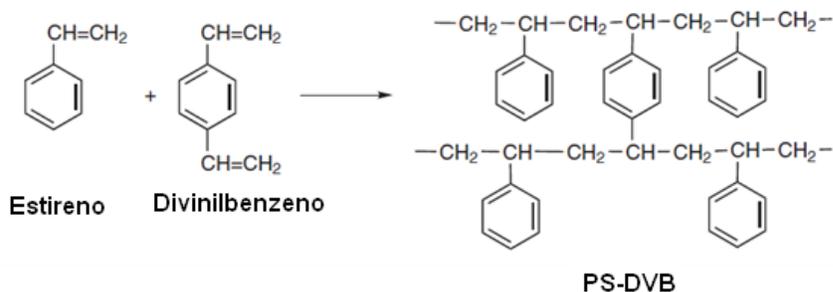


Figura 3: Representação da equação química da reação de formação do poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno (PS-DVB).

1.2.3 Óxidos metálicos

O uso de óxidos metálicos, como alumina, titânia e zircônia e, mais recentemente, os óxidos de cério e tório, como suportes cromatográficos deve-se a duas características principais, a estabilidade química e a excelente estabilidade térmica desses materiais¹⁵. Além disso, esses óxidos metálicos se comportam como trocadores iônicos anfóteros, catiônicos ou aniônicos, dependendo do pH da FM.

Outra diferença, a qual tem um grande impacto no uso das FE baseadas em óxidos metálicos, é a existência de sítios ácidos de Lewis na superfície dos óxidos, que são responsáveis pela habilidade de troca iônica dessas FE. Devido à combinação do mecanismo de retenção em fase reversa e troca iônica, as FE baseadas em óxidos metálicos, quase sempre, apresentam retenção de modo misto e, conseqüentemente, seletividade variada.

A alumina foi o primeiro óxido metálico empregado como suporte cromatográfico, inicialmente em separações em fase normal e, posteriormente modificada por recobrimento polimérico para ser utilizada em separações em FR, impulsionada pela sua estabilidade química em uma extensa faixa de pH (1-12). Entretanto, devido às propriedades de retenção da alumina serem muito parecidas com as da sílica, e por apresentar desempenho cromatográfico inferior, estes materiais foram pouco explorados em aplicações em fase reversa¹⁵.

A zircônia é um óxido metálico que, comparado à sílica, apresenta maior estabilidade mecânica, química (pH de 1 a 14) e térmica (resiste até 200 °C)^{5,15}. O

grande problema de sua utilização é o fato de possuir sítios em sua superfície classificados como sítios ácidos fortes de Lewis. Estes sítios ácidos são promovidos por átomos de zircônio (IV) que não têm todas as suas ligações de coordenação completas e podem interagir com bases fortes de Lewis, como fosfatos, hidróxidos, fluoretos, e outros, produzindo picos com caudas ou até mesmo favorecendo adsorção irreversível. Para prevenir o efeito dos sítios ácidos sobre a superfície da zircônia, adicionam-se bases fortes de Lewis à fase móvel para competir com os grupos básicos do soluto, ou então se pode modificar a sua superfície com fluoretos ou fosfatos⁵.

A titânia tende a ter propriedades e mecanismos de retenção similares à zircônia e em sua superfície existem os chamados grupos titanóis ácidos que, como a sílica, também adsorvem compostos básicos. Entretanto, existem poucas informações a respeito da titânia e das vantagens como suporte cromatográfico, e, até o momento, poucas aplicações envolvendo FE baseadas em titânia têm sido publicadas.

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

1.2.4 Óxidos mistos

Os óxidos mistos são suportes cromatográficos obtidos pela mistura de sílica e de óxido metálico, e, desta forma, combinam as propriedades favoráveis da sílica, como a elevada área superficial, a boa estrutura de poros e a variedade de distribuição de tamanhos, com as propriedades dos óxidos metálicos, como a estabilidade química e térmica. Como resultado, obtêm-se materiais cromatográficos baseados em sílica com estabilidade química e térmica aumentada. Entretanto, o desafio continua sendo o desenvolvimento de métodos de preparo que resultem em partículas com boas propriedades cromatográficas.

1.3 Fases estacionárias para CLAE-FR

A fim de se obterem fases estacionárias reversas, espécies orgânicas podem ser sorvidas, imobilizadas ou quimicamente ligadas ao suporte cromatográfico.

1.3.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas

A modificação da superfície da sílica, dos óxidos metálicos e dos óxidos mistos, com a introdução de uma camada quimicamente ligada ao suporte tem como objetivo principal unir, em um só material, as propriedades químicas dos grupos orgânicos com a rigidez e a estabilidade térmica e hidrolítica do óxido inorgânico⁵.

O método mais comum de obtenção de colunas de fase reversa envolve a introdução de monocamadas orgânicas por meio de reação com reagentes apropriados, sendo que o procedimento de organossilanização é o mais empregado^{5,9}.

Na organossilanização, as fases ligadas são preparadas pela reação dos grupos silanóis da sílica com reagentes organossilanos, resultando em fases estacionárias com ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). Estas fases estacionárias são estáveis hidroliticamente e as colunas recheadas com esse material apresentam eficiências altas, devido aos rápidos efeitos de transferência de massa¹⁷.

As fases estacionárias obtidas por organossilanização apresentam como principal desvantagem a presença de grupos silanóis residuais (que não reagiram) na superfície do suporte, que podem interagir com compostos básicos, provocando o aumento da retenção, alargamento dos picos e até a retenção irreversível dos analitos na FE¹⁷.

Na tentativa de contornar o problema dos silanóis residuais, diversas alternativas são encontradas na literatura, como o capeamento, as fases estericamente protegidas, as com grupos polares embutidos e as fases estacionárias bidentadas¹⁸.

O capeamento consiste em uma reação de silanização com um ou mais reagentes organossilanos de tamanho reduzido, geralmente trimetilclorossilano (TMCS) e/ou hexametildissilazano (HMDS), processo realizado após a etapa de preparo das fases estacionárias, a fim de aumentar o recobrimento do suporte cromatográfico e reduzir o número de silanóis residuais. Com o capeamento, ocorre aumento da estabilidade da FE em pH elevado, assim como o aumento na seletividade das separações, devido ao recobrimento mais homogêneo do suporte cromatográfico¹⁵.

As fases estacionárias estericamente protegidas, por sua vez, são obtidas através da reação do suporte cromatográfico com organossilanos contendo grupos volumosos, como isopropil ou isobutil, ligado à cadeia alquila, a fim de restringir o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais e proteger a ligação siloxano,

evitando a quebra entre a fase ligada e o suporte, quando são empregadas fases móveis ácidas. A Figura 4 apresenta uma fase estacionária estericamente protegida, contendo grupos isobutil ligados diretamente ao átomo de silício e a uma cadeia alquila C18¹⁹.

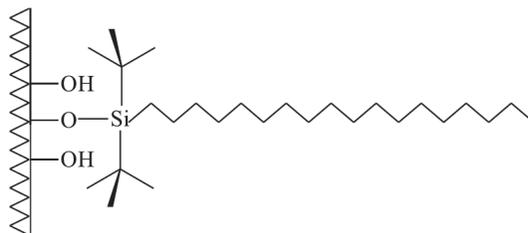


Figura 4: Representação da estrutura de uma fase estacionária estericamente protegida, com grupos isobutil ligados diretamente ao átomo de silício e a uma cadeia alquila C18¹⁹.

As fases estacionárias com grupo polar embutido possuem um grupo polar inserido na cadeia alquila (como os grupos carbamato, tiocarbamato, amida, amina, uréia e éter), geralmente após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano imobilizado. Comumente, os grupos polares empregados nestas FE promovem uma competição com solutos básicos pelos silanóis residuais, estabelecendo uma redução da atividade silanofílica¹⁹. A Figura 5 representa uma FE com grupo polar embutido¹⁵.

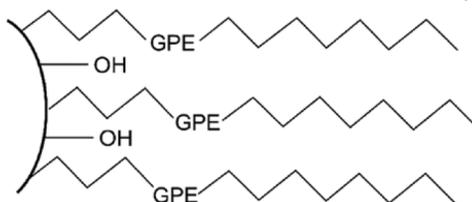


Figura 5: Representação de uma fase estacionária com grupo polar embutido¹⁵.

As fases estacionárias bidentadas são preparadas a partir da modificação da sílica com agentes sililantes bidentados, formados por dois átomos de silício ligados entre si por um grupo etil ou propil, proporcionando maior restrição de acesso aos grupos silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas FM com pH superior a 8. A Figura 6 representa uma FE bidentada, com átomos de silício ligados por um grupo propil, contendo cadeia alquila C18.

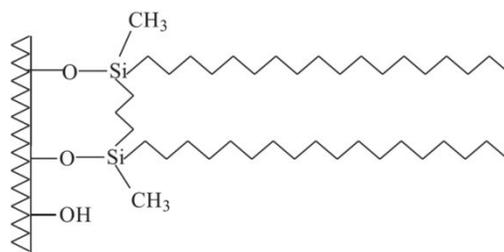


Figura 6: Representação da estrutura da fase estacionária bidentada contendo cadeia alquila C18 e átomos de silício interligados por um grupo propil.

1.3.2 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados

Outra alternativa para reduzir os grupos silanóis residuais na superfície da sílica, baseia-se no recobrimento superficial de suportes óxidos com polímeros orgânicos, cujo objetivo é combinar a resistência mecânica do suporte inorgânico à seletividade e inércia química dos polímeros orgânicos, que são constituídos por uma cadeia polimérica, na qual há presença de dois ou mais monômeros diferentes^{5,9}.

Nas últimas décadas, recobrimentos de suportes óxidos com polímeros de composição química bem definida, têm se tornado um método de grande importância na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR.

A forma mais simples de preparo das fases recobertas com polímeros é através da deposição de uma camada polimérica sobre o suporte¹⁶. Basicamente, o polímero sorvido pode formar uma fina camada na superfície da sílica e/ou preencher completamente os poros da sílica, ligando-se covalentemente aos grupos silanóis da superfície da sílica, ou apenas interagindo fracamente com estes. A Figura 7 representa os dois tipos de deposição polimérica sobre o suporte cromatográfico⁹.

Um importante fator envolvido na preparação das fases sorvidas é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se, por um lado, uma maior quantidade de polímero fornece um material com maior proteção dos silanóis (sílica) ou sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia e alumina) contra interações indesejáveis com a amostra, por outro lado, resultará em uma camada mais espessa e bloqueio dos poros do suporte, resultando em um processo de transferência de massa mais lento, implicando em FE com baixa eficiência^{7,20}.

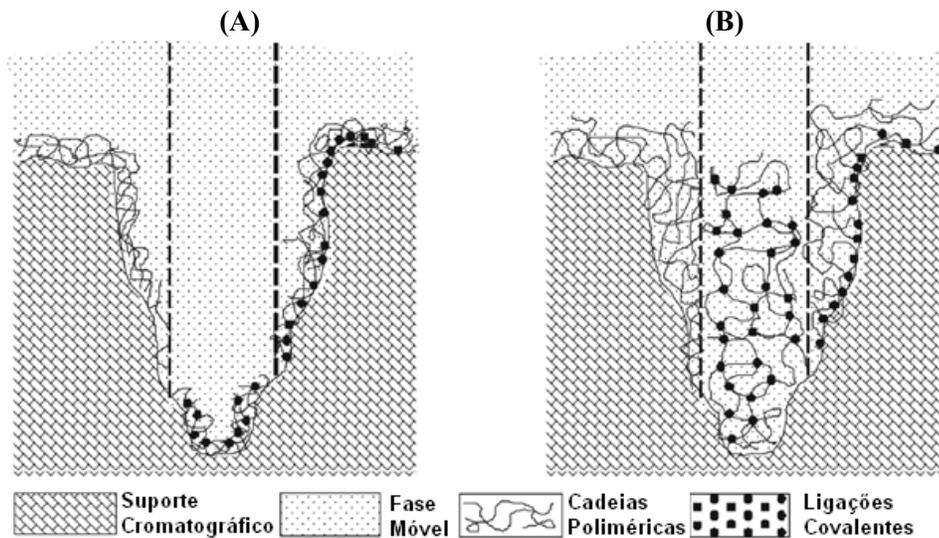


Figura 7: Representação dos tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico: (A) recobrimento das paredes dos poros e (B) preenchimento do volume dos poros.

Assim, a preparação de fases estacionárias sorvidas com polímeros possui a finalidade de obtenção de duas propriedades idealizadas: um filme fino que não bloqueie a entrada dos poros, resultando em rápida transferência de massa nos poros do suporte e no filme polimérico; e uma camada polimérica uniforme para recobrir os sítios não específicos de interações indesejáveis e, se possível, impermeável aos outros solutos a serem separados^{7,20}.

Após o recobrimento do suporte, pode-se fazer a imobilização do polímero nos poros do suporte, que contribui significativamente para obtenção de uma camada uniforme e fina do polímero sobre o suporte cromatográfico, obtendo-se camadas mais estáveis de FE, insolúveis nas fases móveis^{9,17}.

A imobilização de polímeros sobre um suporte poroso é um processo complexo, influenciado pela contribuição dos diferentes tipos de interações entre o suporte e o polímero, assim como pelas propriedades do suporte²¹.

As principais vantagens das fases com polímeros sorvidos e imobilizados sobre as quimicamente ligadas são o maior recobrimento dos sítios ativos do suporte, conferindo maior proteção ao suporte cromatográfico contra o ataque químico de fases móveis alcalinas; a possibilidade de maior seletividade da fase estacionária, devido à disponibilidade de grande variedade de polímeros que possuem diferentes naturezas e grupos funcionais; e a preparação simples destas fases estacionárias^{5,7}.

Existem vários métodos de imobilização^{9,17}, sendo os mais utilizados a auto-imobilização²², o tratamento térmico¹⁶ e radiação por micro-ondas²³.

No Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida da UNICAMP (LabCrom), diferentes fases estacionárias reversas foram sintetizadas a partir da sorção e imobilização de diferentes polímeros, sobre suporte de sílica, sílica titanizada e sílica zirconizada, fornecendo fases estacionárias com diferentes seletividades. Dentre os polímeros já estudados, tem-se o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)^{22,24,25,26}, poli(dimetilsiloxano) (PDMS)^{22,27}, poli(metiloctadecilsiloxano)²⁷, poli(metilfenilsiloxano) (PMPS)²⁰, poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS)¹⁶, o copolímero dimetil-(48-52%)fenilmetil(52-48%)siloxano^{10,28}, o copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMS)²⁹ e o polibutadieno (PBD)²³.

Neste trabalho, objetiva-se preparar fases estacionárias através da sorção e imobilização por micro-ondas do copolímero PFPMS sobre suporte de sílica nua.

1.3.3 Fases estacionárias fenil

Na década de 1970³⁰, foram introduzidas comercialmente colunas cromatográficas para cromatografia líquida em fase reversa, basicamente constituídas por fases estacionárias à base de sílica, modificadas com grupos alquila alifáticos, como os grupos metil (-CH₃), butil (-C₄H₉), octil (-C₈H₁₇) e octadecil (-C₁₈H₃₇), cujo mecanismo de retenção é atribuído exclusivamente às interações hidrofóbicas.

As fases estacionárias contendo outros grupos funcionais ligados à sílica, como os grupos fenil (-C₆H₅), cianopropil (-CH₂)₃CN), aminopropil (-CH₂)₃NH₂) e diol (-OH) foram posteriormente introduzidas no mercado e, atualmente, são bastante utilizadas, em virtude de seu mecanismo de seletividade diferencial, além de sua maior polaridade, uma vez que novas interações moleculares são possíveis entre a FE e os analitos, como as interações de ligação de hidrogênio, interação iônica e interações do tipo π - π , além das hidrofóbicas, conferindo maior seletividade a estas fases em relação às alquilas tradicionais.

A popularidade e a disponibilidade comercial das fases estacionárias fenil têm aumentado significativamente, principalmente devido à seletividade cromatográfica obtida para a análise de solutos aromáticos e que possuam elétrons π , que interagem

através de interações π - π com a FE, que são de grande interesse para separações em CLAE^{30,31}.

As interações do tipo π - π podem ser intra ou intermoleculares, ocorrendo em grupos funcionais insaturados, sendo caracterizadas pelo tipo doador-receptor de elétrons, uma vez que a interação entre os elétrons π da FE e do soluto é favorecida quando a FE é rica em elétrons, atuando como uma base de Lewis, e o soluto é deficiente em elétrons (ácido de Lewis).

A estrutura das fases fenil à base de sílica está representada na Figura 8³¹. A FE fenil pode ser monomérica (nas quais o grupo R pode ser metil ou isopropil), ou polimérica, nas quais o grupo R é um -OH ou -O-Si-O, enquanto que o espaçador (situado entre o átomo de silício e o grupo fenil) pode ser uma cadeia alquila de 0 a 6 átomos de carbono, conferindo diferentes graus de hidrofobicidade e aromaticidade (característica π - π) à FE. A FE pode conter um heteroátomo entre o espaçador e o grupo fenil, sendo geralmente um átomo de oxigênio ou um grupo -CH₂. Além disso, a FE pode conter um ou dois grupos fenil, o que também influencia na hidrofobicidade e na aromaticidade da fase.

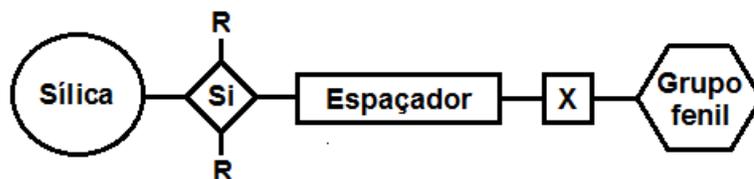


Figura 8: Representação esquemática da estrutura das fases estacionárias fenil: sílica é o suporte cromatográfico; espaçador é uma cadeia alquila de 0 a 6 átomos de carbono; X é um heteroátomo ou um grupo -CH₂; grupo fenil corresponde a 1 ou 2 anéis aromáticos e a tecnologia de ligação pode ser polimérica (R = OH ou Si-O-Si) ou monomérica (R = metil ou isopropil).

Embora a presença de uma cadeia alquila como espaçador não seja requerida para que haja interações do tipo π - π entre a FE e os analitos, o comprimento da cadeia alquila possui efeito significativo na seletividade das separações, uma vez que com o aumento do número de carbonos presentes no grupo espaçador, maior é a seletividade aromática da fase estacionária³². Este comportamento está relacionado com a alteração

conformacional do grupo fenil, dependendo do número de átomos de carbono presente no espaçador.

Estudos de cálculos conformacionais *ab-initio*^{32,33,34} indicam uma relação entre o número de átomos de carbono do grupo espaçador e a orientação do grupo fenila, em relação à superfície da sílica. Espaçadores com número par de carbonos (etil e butil, por exemplo) apresentam o grupo fenil com orientação paralela à superfície da sílica, favorecendo o mecanismo de retenção por adsorção (solutos interagem apenas com os vértices do grupo fenil), enquanto que espaçadores com número ímpar de carbono (metil e propil, por exemplo) apresentam orientação do anel perpendicular ao suporte cromatográfico, favorecendo o mecanismo de partição, no qual os solutos interagem com a face do anel aromático, interagindo com um maior número de grupos fenil presentes na FE. A Figura 9 representa alguns estudos conformacionais que mostram as diferentes orientações do grupo fenil em fases com espaçadores par (etil) e ímpar (propil).

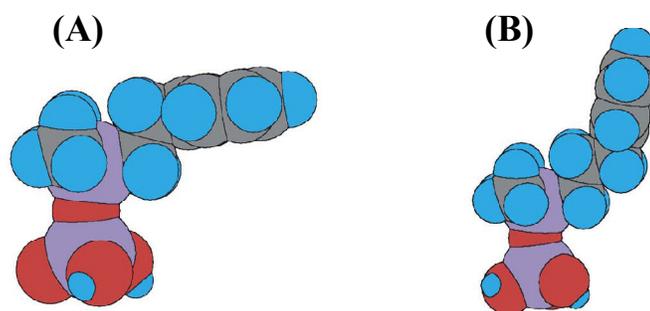


Figura 9: Representação dos estudos conformacionais que indicam a orientação do grupo fenil frente à superfície da sílica, com diferentes espaçadores: (A) grupo etil; (B) grupo propil ligado à superfície da sílica.

Também em termos de seletividade e mecanismos de interação, tem-se que para realização de separações com fases estacionárias fenil, o emprego do metanol como modificador orgânico da fase móvel é altamente recomendado, uma vez que seu uso fornece maior seletividade na separação de analitos do que o uso de solventes que possuem elétrons π em sua estrutura³⁰. A acetonitrila, por exemplo, por conter grupos nitrogênio ligados por ligação dupla, competiria com os analitos para interagir com a FE, podendo também interagir com os próprios analitos, bloqueando as interações dos

solutos de interesse com o grupo fenil da FE, comprometendo, portanto, a seletividade destas fases.

A presença do heteroátomo nas fases fenil confere maior polaridade à fase estacionária, sendo que a coluna comercial mais conhecida contendo um grupo fenoxietil ligado à superfície da sílica é a Synergi Polar RP[®], comercializada pela Phenomex, com o objetivo de otimizar a retenção e a seletividade de compostos aromáticos e apolares, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. No entanto, a vantagem do uso de fases estacionárias fenil com a presença ou não do heteroátomo, depende dos compostos a serem separados e das condições de análise a serem empregadas^{34,35}.

A partir dos trabalhos já publicados³⁶, pode-se observar que as fases estacionárias contendo polissiloxanos fenil substituídos apresentam vantagens na separação de compostos aromáticos em relação às fases estacionárias convencionais C8 e C18 disponíveis comercialmente. Estas vantagens resultam da presença de anéis aromáticos, que conferem polaridade intermediária à fase estacionária contendo grupos fenil, e têm um papel importante na separação, graças às interações tipo π - π com os analitos.

As fases estacionárias fenil têm sido usadas com sucesso para a separação de isômeros de posição, compostos aromáticos polinucleares, nitroaromáticos, princípios ativos farmacêuticos e agrotóxicos de diferentes classes.

Neste trabalho, utilizou-se um copolímero pertencente à classe dos polissiloxanos fenil substituídos, que são compostos muito utilizados para a preparação de fases estacionárias. Os polissiloxanos são constituídos por repetidas cadeias de (-Si-O-) em que cada átomo de silício está ligado a dois grupos funcionais idênticos ou não.

No caso do copolímero PFPMS, há a presença de grupos metil e isopropilfenil ligados a átomos de silício por toda a extensão do copolímero. No entanto, a distribuição destes grupos no copolímero pode ocorrer de diferentes formas, podendo ser aleatórios, alternados, em blocos, entre outras³⁷. A estrutura do copolímero está representada na Figura 10.

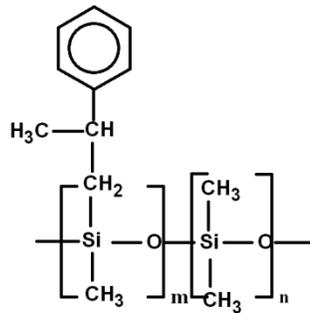


Figura 10: Representação da estrutura do copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PPDMS).

1.4 Radiação micro-ondas

Observando-se o espectro eletromagnético, as micro-ondas (MO) são radiações não ionizantes que correspondem à faixa de comprimento de onda de 1 mm a 1 m e frequências de 30 GHz a 300 MHz, estando entre a radiação do infravermelho e as frequências de rádio, sendo que podem ser irradiadas, refletidas e também utilizadas para aquecimento^{38,39}. A Figura 11 apresenta o espectro eletromagnético e a localização das radiações MO.

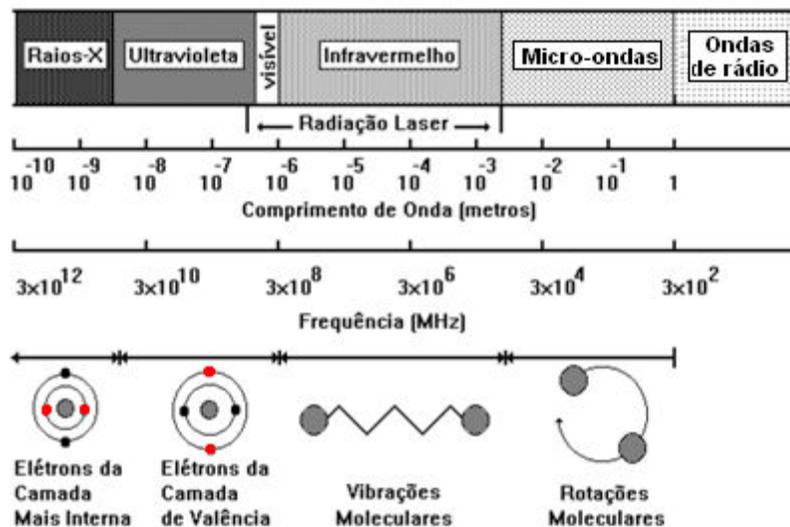


Figura 11: Representação do espectro eletromagnético e da localização das radiações micro-ondas.

As micro-ondas geram o movimento das espécies em solução, através da migração de íons e/ou rotações de dipolo, causadas pelo elevado número de vezes em

que o campo magnético se alterna. Devido a esses mecanismos de conversão de energia eletromagnética em calor, produzido pela interação entre as micro-ondas e as moléculas da amostra, ocorre o aquecimento, sendo um processo diferente dos processos de aquecimento usuais (condução, irradiação e convecção)^{40,41}.

No processo de aquecimento convencional, a energia é transferida para o material, a partir da superfície do material, diferentemente do aquecimento por micro-ondas, no qual a energia é absorvida diretamente no interior dos materiais, por interação molecular com o campo eletromagnético, e propagada para a parte externa do material. Convém ressaltar que a energia envolvida no processo de aquecimento por MO não é suficiente para realizar a quebra das ligações químicas. A Figura 12 esquematiza o processo de aquecimento convencional e por MO^{39,42}.

O mecanismo de aquecimento chamado de rotação de dipolo relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que possuem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado.

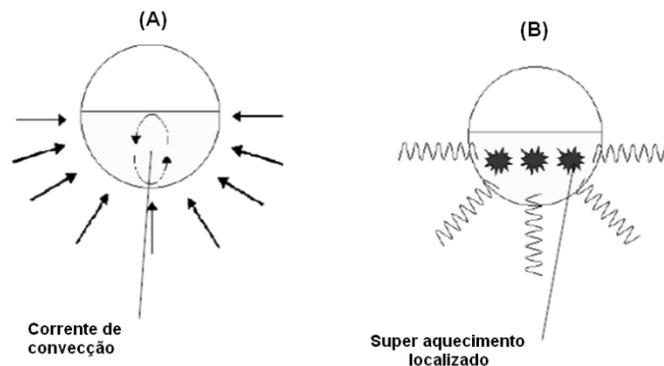


Figura 12: Representação esquemática das diferentes formas de aquecimento: (A) aquecimento convencional, por condução e convecção e (B) aquecimento por micro-ondas.

Como as ondas eletromagnéticas geram campos elétricos positivos e negativos alternados, provoca-se uma desordem e agitação das moléculas dipolares, transformando-se em calor a energia absorvida para o realinhamento das moléculas. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor, resultando em aquecimento rápido. A eficiência do aquecimento por rotação de dipolo depende da temperatura e da viscosidade da amostra.

A frequência de (2450 ± 13) MHz é típica de micro-ondas domésticos, sendo que o alinhamento das moléculas e seu retorno ao estado de desordem ocorre $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, resultando em um aquecimento rápido e eficiente.

O segundo mecanismo de conversão da energia eletromagnética em calor é chamado de condução iônica, sendo que o calor é gerado através da migração de íons dissolvidos, sob a ação de um campo eletromagnético. Os íons se deslocam produzindo um fluxo de corrente, cujo movimento sofre resistência causada por outras espécies com fluxo oposto ao deslocamento. Como resultado desta resistência, há produção de calor, provocando aumento da temperatura do meio. Os parâmetros que afetam a condução iônica são a concentração do íon, seu tamanho e carga, e a temperatura da solução³⁹.

O percentual de contribuição desses dois mecanismos para o aquecimento do material depende da mobilidade e da concentração dos íons e do tempo de relaxação da amostra. Se, em uma amostra, a concentração e mobilidade dos íons for muito baixa, o aquecimento ocorrerá predominantemente através do mecanismo de rotação de dipolo.

A técnica de aquecimento por micro-ondas em química analítica já é conhecida desde a década de 70, sendo que entre as aplicações mais importantes tem-se a digestão de amostras para análise elementar, a extração de diversas substâncias e preparo de amostras e a dessorção térmica de vários compostos^{40,41}.

Dentre as principais vantagens desta técnica, tem-se o rápido aquecimento e a possibilidade de realizar diversas reações simultaneamente.

O instrumento típico de micro-ondas, utilizado em diferentes aplicações analíticas, consiste em seis componentes básicos: o gerador de micro-ondas (magnetron); o guia de ondas, a cavidade das micro-ondas, o refletor giratório (para espalhar as ondas), um circulador e um exaustor de ar⁴³. As microondas são produzidas pelo magnetron, propagadas através do guia de ondas e inseridas diretamente dentro da cavidade do forno onde o espalhador as distribui em diferentes direções sendo, então, absorvidas pelas moléculas das amostras e dos solventes³⁹. A Figura 13 representa um desenho esquemático de um instrumento de MO⁴².

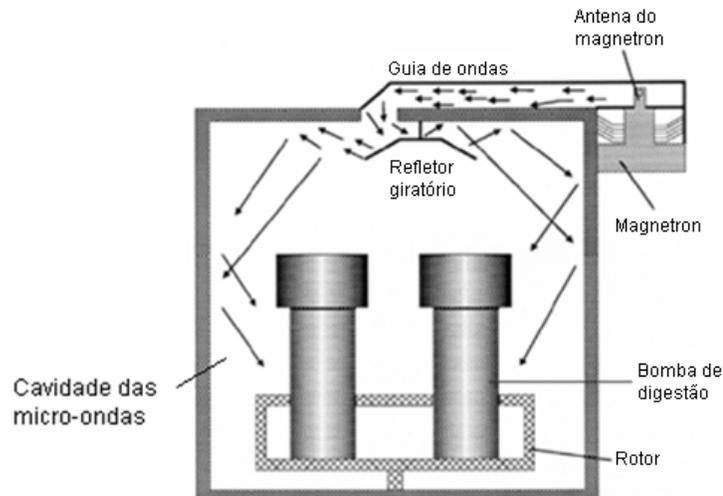


Figura 13: Representação de um instrumento de micro-ondas, com bombas de digestão fixadas em um rotor, sob a ação de micro-ondas, geradas no magnetron e homogeneamente espalhadas por um refletor rotatório.

1.5 Avaliação das colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas são avaliadas através da análise de parâmetros calculados¹ a partir de medidas obtidas nos cromatogramas de misturas de compostos previamente selecionados.

A Figura 14 mostra um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes³.

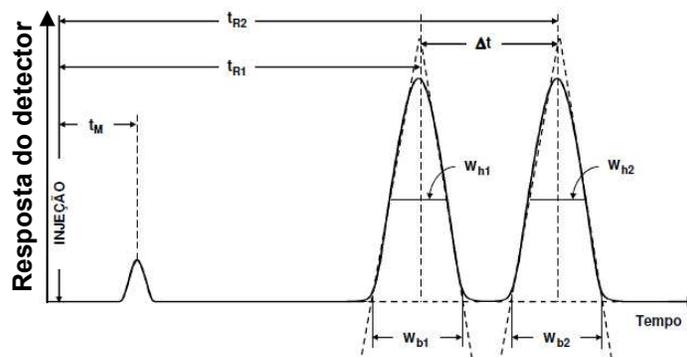


Figura 14: Representação de um cromatograma típico da separação de uma mistura de dois componentes.

A linha base do cromatograma representa a passagem da fase móvel através do detector. Quando os componentes da amostra eluem, registram-se picos cujas áreas ou alturas são proporcionais às concentrações respectivas. A ordem de eluição dos

compostos depende da interação dos analitos com a fase estacionária. Quanto maior a interação do analito com a fase estacionária, maior é o tempo de retenção do soluto.

Os parâmetros cromatográficos que avaliam a separação cromatográfica são:

1) Tempo de retenção do soluto (t_R): é o tempo gasto desde o momento da injeção do soluto até a detecção do máximo do pico correspondente, englobando todo o tempo que o componente fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel, quer na fase estacionária.

2) Tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária ou tempo de retardamento da FM (t_M): é o tempo gasto por um composto não retido pela fase estacionária para percorrer o sistema cromatográfico desde a injeção até a chegada no detector. Normalmente é obtido pelo tempo gasto pela fase móvel percorrer toda a coluna cromatográfica.

3) Tempo de retenção ajustado (t'_R): é o tempo que o soluto fica retido na fase estacionária, sendo calculado pela Equação 1:

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

4) Fator de retenção (k): é determinado pela razão entre os tempos em que o soluto fica retido na fase estacionária e na fase móvel, sendo determinado pela Equação 2:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2)$$

Os valores ideais⁴⁴ para k variam de 1,0 a 10,0. Valores menores que 1,0 indicam pouca interação entre o soluto e a fase estacionária, enquanto valores maiores que 10 indicam interação muito forte com a fase estacionária, resultando em um longo tempo de análise e picos alargados.

5) Resolução entre picos (R_S): é o parâmetro que indica se ocorreu ou não uma boa separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada a partir da Equação 3.

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

sendo:

t_{R1} e t_{R2} : tempos de retenção de dois picos adjacentes envolvidos no cálculo.

w_{b1} e w_{b2} : largura dos picos na base, em unidades de tempo.

w_{h1} e w_{h2} : largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Quando $R_s = 1$, os dois picos comparados são razoavelmente separados com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Valores de R_s acima de 1,5 indicam separação completa entre os picos.

6) Número de pratos (N): é o parâmetro relacionado à eficiência cromatográfica. Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a resolução dos componentes da mistura analisada. Na prática, o número de pratos é uma medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito passa através do sistema e pode ser calculado pela Equação 4.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação do número de pratos entre diferentes colunas. Por essa razão, a avaliação comparativa entre colunas é feita usando-se a eficiência em pratos por metro, que corresponde à razão entre o número de pratos, N, e o comprimento da coluna, L, representada pela Equação 5:

$$N / m = \frac{N}{L} \quad (5)$$

sendo:

L: comprimento da coluna, em metros.

Qualitativamente, a eficiência pode ser avaliada pelo formato do pico cromatográfico. Quanto mais estreito for o pico, maior é a eficiência da coluna na separação do soluto a que o pico se refere. A expressão para o cálculo de número de pratos, ou seja, a eficiência descrita na Equação 4, é válida para picos simétricos. Para picos assimétricos, existem erros no cálculo de N se a Equação 4 for utilizada. Por essa razão deve-se calcular o fator de assimetria (A_s) do pico a 10 % de sua altura.

7) Fator de assimetria do pico a 10 % da sua altura (A_{s10}): é uma medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido horizontal a 10 % da sua altura. A literatura³ indica que o fator de assimetria A_{s10} deve ter valores entre 0,9 a 1,2. Embora menos desejáveis, valores até 1,6 são admitidos. A Figura 15 mostra como é calculada a assimetria.

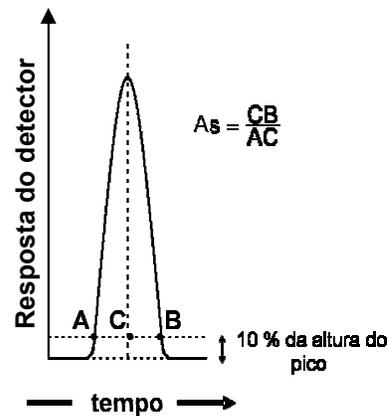


Figura 15: Representação esquemática para determinação do fator de assimetria.

Avaliação comparativa entre colunas também pode ser realizada, utilizando-se a medida da altura de prato (H), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna e o número de pratos (Equação 6):

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

A eficiência de uma coluna também pode ser expressa por meio da equação clássica de van Deemter (Equação 7), que relaciona a altura de prato (H) com a velocidade linear da fase móvel (μ), sendo a última obtida pela razão entre o

comprimento da coluna, em metros, e o tempo de retenção de um soluto não retido na FE.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (7)$$

O termo A da Equação 7 (difusão turbilhonar) é responsável pelo alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto no interior da coluna cromatográfica. Uma forma de minimizar este efeito é utilizar colunas de diâmetro interno reduzido e partículas pequenas e uniformes.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na FM e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares de fase móvel.

O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE. O termo C está subdividido em C_M e C_S , onde C_M é a transferência de massa na FM e C_S , a transferência de massa na FE. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

A curva de van Deemter está representada na Figura 16, indicando que há uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$), na qual H terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de seleccionar a vazão ótima de uma análise cromatográfica.

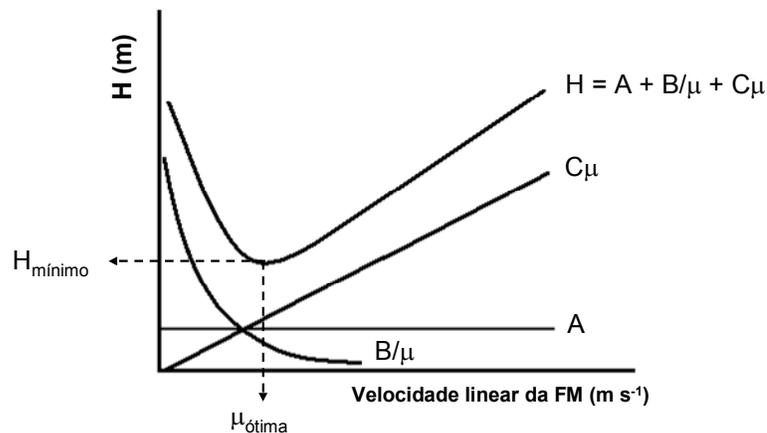


Figura 16: Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho envolve a preparação de novas fases estacionárias, sorvidas e imobilizadas por micro-ondas, para CLAE-FR, utilizando-se suporte de sílica nua recoberto com o copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMS), a fim de se obterem fases estacionárias que apresentem alta eficiência, estabilidade química, repetibilidade e aplicabilidade.

Na primeira etapa do trabalho, objetivou-se a preparação de fases estacionárias sorvidas com diferentes quantidades do copolímero, a fim de determinar a carga copolimérica que resulta em melhor eficiência na separação dos compostos de duas misturas teste, contendo analitos básicos, ácidos e neutros.

Na segunda etapa, após a definição da melhor carga copolimérica, realizou-se o processo de imobilização do copolímero por radiação micro-ondas, objetivando-se a obtenção de fases estacionárias que apresentem alta eficiência, repetibilidade e estabilidade química. Estes aspectos foram avaliados e definidos com base em testes físicos, químicos e cromatográficos, além da fase estacionária ser avaliada segundo aspectos de seletividade e campo de aplicação.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

- Acenafteno 99%, marca Aldrich, lote 13631.
- Acenaftileno 99%, marca Aldrich, lote 11303EE.
- Acetofenona 99%, marca Vetec, lote 0503530.
- Ácido acetilsalicílico 99%.
- Ácido fosfórico 85%, marca Synth.
- Ácido trifluoracético 98%, marca Sigma-Aldrich, lote 10812LH.
- Água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore).
- Anilina 99%, marca Fluka.
- Antraceno 99%, marca Fluka, lote 1245722
- Atrazina 98%, marca Novartis.
- Benzeno p.a., marca Labsynth, lote 36021.
- Benzilamina 99%, marca Merck.
- Benzoato de metila 99%, Carlo Erba.
- Benzonitrila, marca Riedel-de Haën, lote 4220.
- Bifenil 99%, marca Sigma-Aldrich, lote 04709BC.
- Bromidrato de dextrometorfano 99%, Sigma, lote 097K1348.
- Butilbenzeno 99%, marca Aldrich.
- Butilparabeno 99%, marca Sigma.
- Cafeína 100 % USP, Aldrich.
- Bicarbonato de potássio 99%, marca Synth, lote 105148.
- Carbonato de potássio anidro 99%, marca Synth, lote 111682.
- Cianazina 98%, marca Cyanamid.
- Clorofórmio p.a., marca Tedia.
- Diazepam 99%, Medley.
- Diclorometano p.a, marca Tedia.
- Dipropilftalato 99%, marca Aldrich.
- Diurom 99%, marca Du Pont.
- Etilbenzeno 99%, marca Aldrich.

- Fenantreno 99%, marca Carlo Erba.
- Fenol 99%, marca Fluka, lote 1393377.
- Fluoranteno 99%, marca Aldrich, lote 05704ED.
- Fluoreno 99%, marca Aldrich.
- Fosfato de potássio dibásico anidro 98%, marca Synth.
- Fosfato de potássio monobásico anidro 99%, marca Synth.
- Hidroclorato de amitriptilina 99%, Aldrich, lote 03925MN.
- Hidroclorato de nortriptilina 99%, Sigma.
- Imazaquim 99%, marca Riedel-de Haën.
- Levofloxacin hemiidratada 99%.
- Linurom 99%, marca Du Pont.
- m-cresol 99%, marca Merck.
- Metanol grau HPLC, marca Tedia.
- N,N-dimetilanilina 98%, marca Fluka.
- Naftaleno para síntese, marca Vetec, lote 6157.
- o-terfenila 99%, marca Merck.
- Paracetamol 99%, Medley.
- Pasta para esmerilhar válvulas, marca Carborundum, nº 360 (fina) e 361 (média).
- Pentilbenzeno 99%, marca Aldrich, lote S29342-355
- Pireno 98%, marca Aldrich, lote S22012-337.
- Propranolol 99%, marca Aldrich.
- Propilbenzeno 99%, marca Aldrich, lote 04322AA-415.
- p-xileno 99%, marca BDH.
- Tolueno p.a., marca Merck.
- Trifenileno 98%, marca Fluka, lote 1184125.
- Uracila 98%, marca Aldrich, lote 09319DF.

3.2 Colunas cromatográficas comerciais

- Coluna Fenil-Hexil Zorbax® Eclipse Plus, duplamente capeada, fabricada pela Agilent, tamanho de partícula de 5 µm, comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 4,6 mm, PN:959993-912, SN: USPHB01083, LN: B08015.

- Coluna C18 Nova Pak[®], capeada, fabricada por Waters, tamanho de partícula de 4 µm, comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 3,9 mm, PN: WAT086344, SN: 11193706413650.

3.3 Equipamentos

- Agitador magnético, marca Fisatom, modelo 752.
- Agitador rotatorque, marca Marconi, modelo MA 161.
- Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros, marca Quantachrome Instruments, modelo NOVA 4200 e.
- Analisador elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), marca Perkin Elmer, modelo 2400.
- Analisador termogravimétrico, marca TA Instruments, modelo TGA 2950.
- Balança analítica com precisão de 0,0001g, marca Fisher Scientific, modelo A-250.
- Banho de ultrassom, marca Thornton, modelo T14.
- Bomba a vácuo 60 Hz e 3,5 mA, marca Millipore, modelo WP6111560.
- Bomba HPLC, marca Waters, modelo 510, do tipo recíproca de pistão duplo.
- Bomba pneumática Haskel, empregada no enchimento de colunas cromatográficas, marca Flutrol, modelo 51769, série 297-240, com faixa de pressão disponível de 6,9 a 344,8 MPa.
- Cromatógrafo a líquido modular, marca Shimadzu, constituído por bomba de alta pressão modelo LC-10ADVP, detector UV-Visível SPD-10AVP, forno de coluna CTO-10ASVP, injetor automático SIL-10ADVP e sistema controlador SCL-10AVP, acoplados a um microcomputador e controlados pelo programa computacional de aquisição e tratamento de dados CLASS-VP, versão 6.12 SP2 (sistema cromatográfico utilizado para avaliação da estabilidade das colunas).
- Cromatógrafo a líquido modulares, marca Shimadzu, constituído por bomba HPLC LC-10ADVP, detector UV-Visível SPD-10AVP e forno para coluna cromatográfica modelo CTO-10AVP (cromatógrafo A) e modelo CTO-ASVP (cromatógrafo B), com injetor Rheodyne 8125, com alça de amostragem de 5 µL, acoplados a um microcomputador e controlados pelo programa Chrom Perfect Spirit, versão 5.5.6, fornecido pela *Justice Laboratory Software* (sistemas utilizados para avaliação cromatográfica das colunas).

- Difratorômetro de raios X da marca PANalytical, modelo X'Pert PRO MPD, pertencente ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT), constituído por anodo de cobre, goniômetro Theta-Theta, sistema de rotação de amostras e detector X'Celerator.
- Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, marca Bomem, modelo MB100.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz Avancell, marca Bruker.
- Estufa a vácuo Yamato, modelo ADP-21, com intervalo de temperatura de 5 a 240 °C.
- Mandril, marca Shulz, modelo FSB, para polimento de colunas.
- pHmetro de bancada, marca Metrohm Pensalab, modelo 827.
- Sistema de deionização de água, Milli-Q-Plus, marca Millipore.
- Sistema de Micro-ondas, marca Milestone, modelo START E.

3.4 Suporte cromatográfico

Como suporte cromatográfico foi utilizado a sílica porosa Kromasil[®], da AkzoNobel, tipo B (área superficial de 295 m²/g), forma esférica, tamanho de partícula médio de 5 µm, tamanho de poro de 11,5 nm e lote 5052.

3.5 Fase estacionária líquida

Como FE líquida foi utilizado o copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (PFPMs), produzido pela Gelest, Inc.[®], Lote: 8C-12390 e código 215-547-1015. O PFPMs possui viscosidade de 1000 cSt, densidade igual a 1,02 g/cm³ (25 °C), ponto de fusão inferior a -40 °C e ponto de ebulição superior a 205 °C.

3.6 Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas são constituídas por materiais inertes, de diâmetro interno uniforme, capazes de resistir à elevadas pressões (de enchimento e pressões utilizadas nas análises por CLAE) e devem ser quimicamente resistentes às fases móveis. A maioria das colunas é produzida de aço inoxidável 316 devido à rigidez e força mecânica.

A superfície das paredes internas do tubo exerce influência sobre a eficiência da coluna, sendo necessários tubos de diâmetro interno preciso e com a superfície polida.

O comprimento da coluna afeta a eficiência da coluna e a velocidade de separação dos analitos. Colunas maiores resultam em tempos de análises mais longos, mas com maior eficiência que as colunas mais curtas.

O diâmetro interno da coluna influencia na capacidade de aceitação de amostra, na velocidade linear da FM e no alargamento dos picos cromatográficos. Quanto maior o diâmetro, maior a capacidade de aceitação da amostra e maior a vazão a ser utilizada. Entretanto, o alargamento da banda aumenta com o diâmetro interno.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas colunas cromatográficas polidas, com 60 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, a fim de reduzir os gastos dos materiais disponíveis (sílica, polímero e fase móvel). As colunas foram confeccionadas na oficina mecânica da UNICAMP, a partir de tubos de aço inoxidável 316, sem costura.

As paredes internas das colunas foram polidas utilizando-se a técnica desenvolvida no LabCrom, por Collins *et al.*⁴⁵, na qual uma haste metálica, envolta em lã de aço e pasta de polimento com partículas abrasivas, foi fixada em um mandril e passada através dos tubos das colunas, em movimento de sobe e desce, até obtenção de uma superfície lisa e isenta de imperfeições, quando observada a olho nu. Uma representação esquemática do sistema utilizado para polimento está apresentada na Figura 17. Após o polimento, os tubos foram deixados em uma solução aquosa de ácido nítrico 50% (v/v) por 24 horas, lavados posteriormente com detergente, água deionizada e etanol, a fim de remover completamente a pasta de polimento²⁸.

O polimento interno da coluna é necessário para garantir que a superfície interna contribua para melhor fluxo da fase móvel durante o enchimento das colunas, bem como durante as análises, assegurando uma boa eficiência cromatográfica.

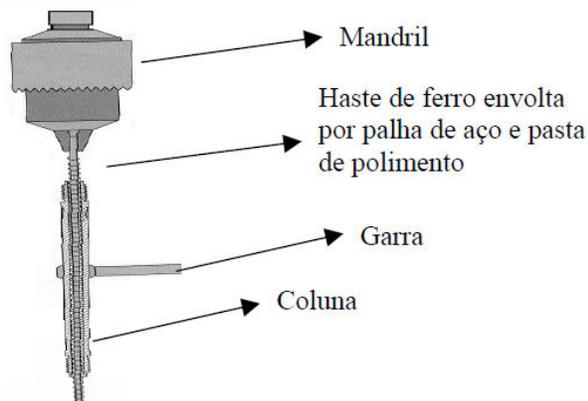


Figura 17: Representação esquemática do sistema utilizada para realização do polimento das paredes internas das colunas cromatográficas.

A coluna é acompanhada por acessórios, 2 mangas com filtro, 2 redutores de volume, 2 porcas terminais e 2 tampas de metal, que são conectados em cada uma das extremidades da coluna. A Figura 18 representa o esquema da coluna e seus acessórios.

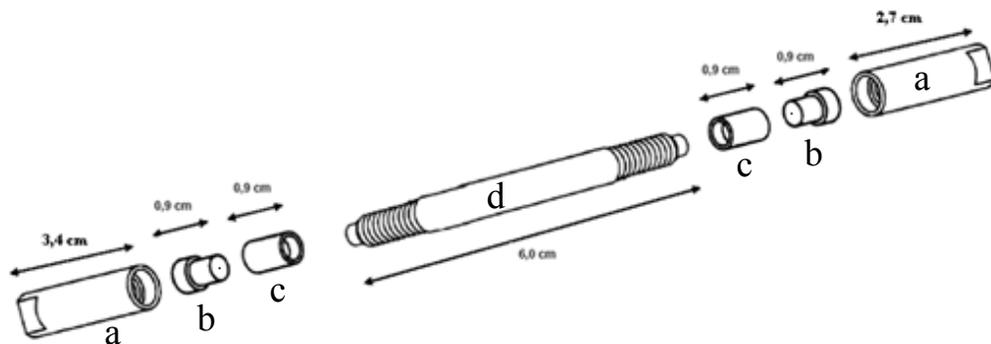


Figura 18: Representação esquemática da coluna cromatográfica e seus acessórios: (a) porcas terminais; (b) redutores de fluxo; (c) mangas com filtro retentor e (d) corpo da coluna.

3.7 Preparação das fases estacionárias

As fases estacionárias são preparadas através das etapas de sorção e imobilização do copolímero na superfície da sílica nua, seguido da extração do copolímero não imobilizado.

3.7.1 Sorção da fase líquida ao suporte cromatográfico

O copolímero poli(2-fenilpropil)metilsiloxano foi sorvido à superfície e aos poros da sílica, utilizando-se o método de evaporação estática do solvente, no qual se prepara

uma suspensão de sílica e uma solução do copolímero, separadamente, em um solvente adequado e, em seguida, a solução polimérica é adicionada lentamente à suspensão de sílica.

Inicialmente, realizou-se a ativação da sílica nua em estufa à vácuo a 140 °C por 16 horas, a fim de remover as moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica, facilitando a adsorção posterior do copolímero orgânico. Após a ativação, a sílica foi deixada em dessecador até atingir a temperatura ambiente, antes de ser utilizada na preparação das fases estacionárias.

Após ativação do suporte cromatográfico, preparou-se uma suspensão 10% (m/v) de sílica em diclorometano e outra solução 10% (m/v) do PFPMS também em diclorometano. As misturas foram agitadas por 10 minutos em agitador magnético e sonicadas por 10 minutos, separadamente. Após, adicionou-se a solução de PFPMS à suspensão de sílica e a mistura foi agitada por 10 minutos, sonicada também por 10 minutos e agitada por mais 3 horas. O béquer, contendo a mistura, foi fechado com papel alumínio com pequenos furos para facilitar a evaporação do solvente e impedir a contaminação da mistura com pequenas partículas, ficando em repouso, na capela, durante 6 dias.

A carga copolimérica (CCP) necessária para preencher os poros do suporte cromatográfico é calculada a partir do produto da densidade do copolímero PFPMS e do volume total de poros da sílica nua, de acordo com as Equações 8 e 9.

$$\bar{m}_{\text{copolímero}} = d_{\text{copolímero}} \cdot V_{\text{poro SiO}_2} \quad (8)$$

$$\% \text{ Carga do copolímero} = \frac{\bar{m}_{\text{copolímero}}}{1 + \bar{m}_{\text{copolímero}}} \cdot 100 \quad (9)$$

sendo:

$\bar{m}_{\text{copolímero}}$: quantidade mínima necessária de PFPMS para preencher todos os poros de 1 g de sílica.

$V_{\text{poro SiO}_2}$: volume médio de poros da sílica.

$d_{\text{copolímero}}$: densidade do copolímero utilizado como fase estacionária líquida.

Uma vez que $d_{\text{copolímero}} = 1,02 \text{ g/cm}^3$ e $V_{\text{poro SiO}_2} = 0,85 \text{ cm}^3/\text{g}$, tem-se que a porcentagem de carga do copolímero para preencher os poros do suporte cromatográfico é de 46,4%.

Assim, foram preparadas duas fases com excesso de carga copolimérica (50 e 55%), evitando problemas devido às perdas do copolímero durante o preparo, e uma fase com excesso de sílica (carga copolimérica de 40%), objetivando-se obter uma carga adequada de copolímero (massa de copolímero em relação à massa de sílica) para o preparo das fases estacionárias.

Após avaliação cromatográfica das diferentes fases sorvidas, selecionou-se a melhor carga copolimérica, a partir da qual foram sintetizadas novas fases estacionárias, com o copolímero sorvido e imobilizado por radiação micro-ondas.

3.7.2 Imobilização do copolímero ao suporte cromatográfico

Após a sorção do copolímero PFPMS ao suporte de sílica, a fase foi submetida ao processo de imobilização por radiação micro-ondas, utilizando-se tubos de TFM⁴⁶ (quimicamente inerte) e água deionizada como referência para o controle da temperatura.

A etapa de imobilização é necessária, uma vez que aumenta a intensidade da interação do copolímero com o suporte, evitando sua lixiviação com a passagem da fase móvel.

As fases estacionárias sorvidas foram imobilizadas através de dois ciclos de aquecimento, com um intervalo de 15 minutos de resfriamento entre os ciclos, sob constante agitação. Por exemplo, para a FE imobilizada a 720 W (144 °C) por 70 min, utilizaram-se dois ciclos seguidos, cada um programado com 15 minutos de aquecimento até a temperatura de 144 °C, 35 minutos de permanência na temperatura desejada e 15 minutos de resfriamento até a temperatura ambiente.

A etapa de esfriamento durante a imobilização das fases por micro-ondas é necessária para evitar a degradação da fase estacionária, uma vez que esta pode ocorrer quando a fase é submetida a tempo de imobilização longo e contínuo, conforme estudos realizados por Morais²³.

3.7.3 Extração do excesso do copolímero

Após a imobilização do PFPMS sobre a sílica, deixou-se a FE em repouso na capela, por um período de 8 dias, a fim de que a imobilização fosse efetiva. Após esse período, a FE foi submetida à extração com solventes, a fim de eliminar o copolímero não imobilizado na superfície da sílica, que causaria menor velocidade de transferência de massa do soluto entre a FE e a FM, e menor repetibilidade entre as análises.

A extração foi realizada utilizando-se uma bomba de alta pressão e tubos de aço inox (comprimento de 100 mm e diâmetro interno igual a 10 mm) contendo a FE imobilizada. Realizou-se a extração com clorofórmio por 3 horas a uma vazão de 1,0 mL/min, seguido da extração com metanol por 2 horas, também a uma vazão de 1,0 mL/min. O clorofórmio foi definido como solvente extrator por solubilizar totalmente o copolímero e por fornecer fases com melhores parâmetros cromatográficos do que as submetidas à extração com outros solventes, conforme definido por Lourenço²⁸, para polímeros do tipo fenil.

Após o período de extração, a FE foi retirada do reservatório, transferida para um béquer e deixada na capela, sob fluxo de gás nitrogênio, para evaporação total do solvente. Após esta etapa, parte das fases estacionárias foi separada para realização da caracterização físico-química, enquanto o restante foi preparado para o enchimento das colunas, a fim de realizar a avaliação cromatográfica.

3.8 Caracterização físico-química da FE líquida, suporte cromatográfico e fases estacionárias

A sílica porosa Kromasil[®] utilizada como suporte cromatográfico para a síntese das fases estacionárias com o copolímero PFPMS sorvido e imobilizado foi caracterizada através das técnicas de difratometria de raios X, termogravimetria e determinação de área superficial, volume e diâmetro de poros. O copolímero PFPMS foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, termogravimetria e RMN de ¹³C.

As fases estacionárias preparadas foram analisadas pelas técnicas de porcentagem de carbono, análise termogravimétrica, espectroscopia de absorção no infravermelho, RMN de ¹³C e ²⁹Si e determinação de área superficial, volume e diâmetro de poros.

O princípio básico das técnicas utilizadas e as condições de análise empregadas estão descritos a seguir.

3.8.1 Difratomia de raios X

A difração de raios X por um material cristalino é constituída pelo processo de interferência construtiva causada pela incidência de um feixe de raios X em um material com estrutura cristalina⁴⁷.

Na técnica de difração de raios X por pó, um feixe de raios X é direcionado para a amostra pulverizada, espalhada sobre um suporte específico, e a intensidade da difração é medida quando o detector é movido em diferentes ângulos. O padrão de difração obtido é característico e único do material da amostra e pode ser identificado por comparação com padrões de bases de dados.

O difratograma da sílica Kromasil[®] foi obtido no difratômetro PANalytical, modelo X'Pert PRO MPD, pertencente ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT), a uma tensão de 45 kV e corrente de 40 mA, no intervalo de 10 a 70 °2Teta, a uma velocidade de varredura de 60 s/passos e passo de 0,017 °2Teta, utilizando-se fenda divergente de 1/2°.

3.8.2 Análise elementar

A análise elementar foi utilizada para determinar o teor de carbono presente nas fases imobilizadas por micro-ondas, a fim de se avaliar o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico pelo copolímero PFPMS.

A análise elementar foi realizada no Analisador Elementar de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, marca Perkin Elmer, modelo 2400, pesando-se de 2 a 3 mg da amostra em uma cápsula de estanho. A cápsula de estanho, contendo a amostra, por sua vez, foi submetida ao aquecimento à temperatura elevada (900 a 1200 °C), a fim de converter o material orgânico em vapores de H₂O, CO₂ e NO_x, que são reduzidos a CO₂, N₂ e H₂, por um catalisador de cobre e quantificados, fornecendo as porcentagens de C, N e H nas amostras. As análises foram realizadas em duplicata e a porcentagem de carbono das fases estacionárias preparadas foi obtida com erro de 1%, inerente ao equipamento.

3.8.3 Análise termogravimétrica

Nas análises térmicas⁴⁸, as variações das propriedades físicas ou químicas de uma substância são medidas em função da temperatura. As técnicas mais utilizadas são a termogravimetria (TG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria diferencial de varredura.

Em TG, tem-se a medida da mudança de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo, sendo a massa da amostra continuamente monitorada, enquanto a temperatura aumenta a uma razão constante. Por sua vez, em DTA, ocorre a medida da diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência em função da temperatura, quando a substância e a referência são submetidas a um processo térmico controlado. Já em DSC, tem-se a medida da diferença de energia cedida a uma substância e a um material de referência, em função da temperatura, quando ambos são submetidos a um processo térmico.

A termogravimetria foi utilizada para a caracterização da sílica nua e do copolímero PFPMS, a fim de se obterem informações acerca da estabilidade térmica destes compostos. As informações provenientes da análise do copolímero por TG são utilizadas para controlar a temperatura máxima de imobilização a ser utilizada no micro-ondas, evitando a degradação do copolímero. A análise da sílica nua por TG fornece informações acerca da absorção de água pelo material, indicando a temperatura de secagem mais adequada para a ativação da sílica.

As análises foram realizadas em um analisador termogravimétrico, marca TA Instruments, modelo TGA 2950, sob atmosfera oxidante e inerte, de 25 a 1000 °C, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min. Os termogramas foram obtidos em porcentagem de perda de massa em função da temperatura e as curvas DTG (termogravimetria derivada) representam a taxa de variação de massa em função da variação da temperatura.

3.8.4 Área superficial específica, volume e diâmetro de poros

Os materiais porosos podem ser classificados em três formas, dependendo-se de seu tamanho de poro, sendo: microporosos (diâmetro de poro de até 2 nm),

mesoporosos (diâmetro de poro entre 2 e 50 nm) e macroporos (diâmetro de poro maior que 50 nm).

O método mais comum para determinação das propriedades de superfície e dos poros dos materiais é a medida de sorção, utilizando-se gás nitrogênio a 77 K (temperatura na qual o gás se encontra no estado líquido à pressão ambiente), baseada na interpretação quantitativa das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio. As isotermas envolvem a quantidade de gás absorvido pelo material que está sendo analisado, em função da pressão relativa (razão entre a pressão de equilíbrio e a pressão de vapor de saturação do gás nitrogênio).

Para a realização de medidas de sorção, inicialmente realiza-se a desgaseificação do material, através da elevação da temperatura, o que acelera a eliminação de umidade e de gases adsorvidos.

As análises de área superficial específica, volume e diâmetro de poros foram realizadas em um Analisador de Área Superficial e Tamanho de Poros, marca Quantachrome, modelo NOVA 4200 e, sendo a desgaseificação dos materiais realizada sob vácuo, à temperatura de 120 °C.

Para a determinação da área superficial, utilizou-se o método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET), que determina a área superficial através da soma das áreas de superfície interna (paredes dos poros) e externa do material e, para a obtenção do tamanho e volume de poros, utilizou-se o método de Barret, Joyner e Hallenda (BJH), que considera que os poros do material são cilíndricos e é aplicado nas isotermas de adsorção ou dessorção obtidas para o material em análise.

3.8.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si e ^{13}C

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) refere-se à interação entre a radiação eletromagnética e os núcleos atômicos dos analitos que possuem momentos magnéticos, angulares e de spin. Quando um campo magnético externo é aplicado sobre os núcleos, estes saem de seu estado de equilíbrio e, ao retirar o campo, os núcleos voltam ao seu estado fundamental.

Os deslocamentos químicos no espectro de RMN são muito sensíveis à estrutura e conformação da molécula, às interações intermoleculares, à troca química e às mudanças de conformação.

3.8.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica utilizada para identificar um composto e investigar sua composição química, baseada no fato das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas. Quando as moléculas interagem com a radiação eletromagnética, diferentes tipos de vibrações ocorrem, sendo as mais comuns as deformações axiais (estiramento simétrico e assimétrico) e as deformações angulares (simétrica e assimétrica no plano e fora do plano). Os diferentes tipos de deformações moleculares estão representadas na Figura 20.

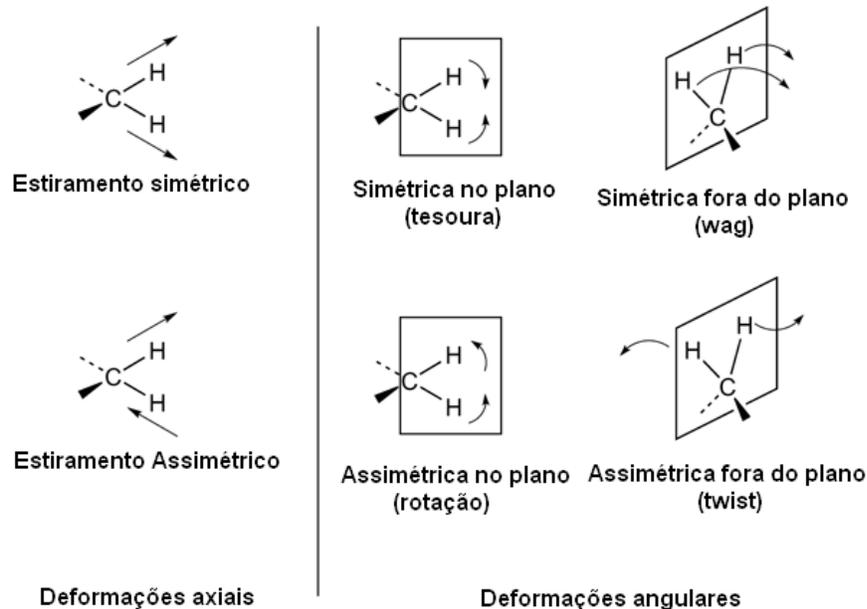


Figura 20: Representação dos diferentes modos de vibração das moléculas, quando submetidas à radiação infravermelho.

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho se estende de aproximadamente 0,75 μm até quase 1 mm, mas o segmento mais frequentemente utilizado está situado entre 2,5 e 25 μm (4000 a 400 cm^{-1}), conhecido como região fundamental ou infravermelho médio.

As modalidades de análise por infravermelho mais empregadas são por transmissão e refletância difusa. A modalidade por transmissão utiliza pastilha de KBr, sendo uma matriz não absorvente na região do infravermelho. A refletância difusa, por

sua vez, é complementar ao modo de transmissão, uma vez que as intensidades relativas das bandas são diferentes nestas duas modalidades. Por exemplo, as bandas fracas observadas no espectro por transmissão (onde a luz penetrou profundamente na matriz) aparecerão mais fortes na refletância difusa, que reflete aleatoriamente a radiação⁵⁰.

As análises por espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas em um espectrofotômetro Bomem com transformada de Fourier, modelo MB-100, operando na região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , velocidade de 20 varreduras por minuto e 16 varreduras por espectro. As amostras foram analisadas utilizando-se celas para líquido (janela NaCl) e a técnica de pastilha de KBr. Os espectros de refletância difusa no infravermelho (RD-IV) foram obtidos no mesmo espectrofotômetro, ao qual foi acoplado um acessório específico, sendo as análises realizadas nas mesmas condições, exceto pelo número de varreduras por espectro, que foi de 256 varreduras.

3.9 Enchimento das colunas cromatográficas

Após a etapa de extração do excesso de copolímero, suspensões das fases estacionárias Si(PFPMS) foram preparadas para a realização do enchimento das colunas e posterior avaliação cromatográfica.

3.9.1 Suspensão da fase estacionária

As suspensões de fase estacionária foram preparadas em um solvente de suspensão, que possui a função de impedir a aglomeração e a sedimentação das partículas da fase estacionária¹⁵. Neste trabalho, foi empregado o clorofórmio como solvente de suspensão, embora possua toxicidade elevada.

As suspensões das fases estacionárias, utilizadas para fazer o enchimento das colunas, foram preparadas em tubos de ensaio com rosca de vedação, utilizando uma concentração de 10% (m/v) em clorofórmio (0,75 g de FE em 7,5 mL de clorofórmio). As suspensões ficaram em agitação, num agitador rototorque, por, no mínimo, 12 horas antes da realização do enchimento.

3.9.2 Recheio das colunas com a fase estacionária

O sistema utilizado para o enchimento da coluna cromatográfica com a fase estacionária está esquematizado na Figura 21.

A bomba de enchimento é do tipo pneumática, na qual o solvente propulsor é deslocado mediante a pressão exercida por um gás inerte (nitrogênio). Essa bomba está acoplada ao reservatório de suspensão (6) constituído por tubo de aço inoxidável sem costura e polido, que por sua vez, está conectado à coluna cromatográfica. Na extremidade oposta da coluna são conectados um filtro poroso e as peças terminais, a fim de evitar a perda da fase estacionária, mas permitir a passagem do solvente propulsor.

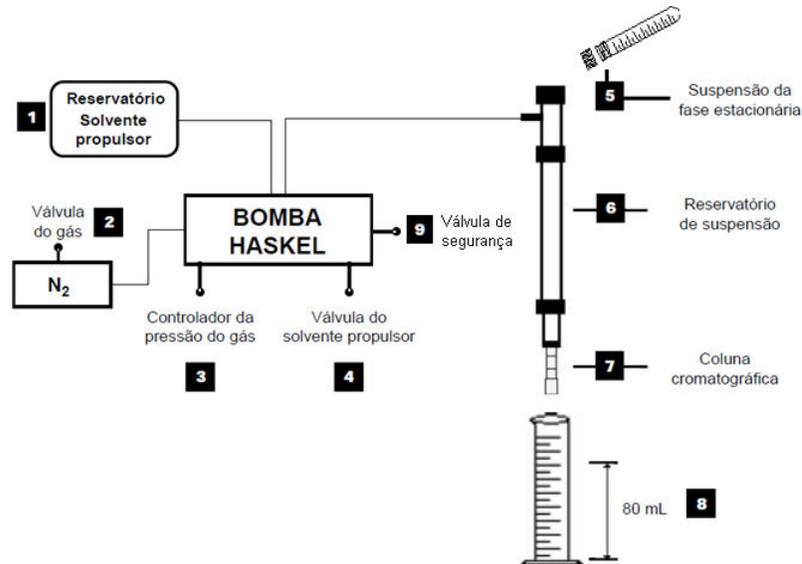


Figura 21: Representação esquemática do sistema de enchimento das colunas.

Para realização do enchimento da coluna cromatográfica com a fase estacionária sintetizada, os seguintes passos devem ser seguidos:

- 1) Preencher o reservatório de solvente da bomba pneumática com metanol filtrado.
- 2) Fechar a válvula do solvente (4), abrir a válvula de nitrogênio (2) e, posteriormente, abrir a válvula de segurança (9).
- 3) Fechar a válvula de controle de pressão do gás nitrogênio (3) até obter a pressão desejada de 6000 psi (41,4 MPa).

- 4) Transferir a suspensão da fase estacionária (5) para o reservatório de suspensão (6) e completar o volume do sistema com clorofórmio.
- 5) Fechar a extremidade superior de reservatório de suspensão (6).
- 6) Colocar uma proveta de 100 mL (8) na extremidade inferior da coluna cromatográfica.
- 7) Abrir a válvula do solvente (4) e deixar passar 80 mL do solvente propulsor metanol, que será recolhido na proveta (8) de 100 mL.
- 8) Após a passagem de 80 mL de solvente, fechar a válvula do solvente (4).
- 9) Desconectar a coluna do reservatório e na extremidade da coluna que estava ligada ao reservatório, adaptar os acessórios restantes (7).
- 10) Fechar a válvula de segurança (9), abrir a válvula de controle de pressão do gás nitrogênio (3) e fechar a válvula de nitrogênio (2).
- 11) Abrir a válvula do solvente e a extremidade superior do reservatório de suspensão para coletar o solvente residual do sistema.

A pressão do sistema deve ser mantida constante durante o enchimento da coluna, contribuindo para a obtenção de um leito bem compactado e homogêneo, ideal para separações cromatográficas.

Após a avaliação cromatográfica, as colunas são esvaziadas no mesmo sistema representado na Figura 21, para serem utilizadas com outras fases estacionárias. A única diferença é que a coluna é acoplada ao reservatório de suspensão, sem nenhum acessório em sua extremidade inferior, para permitir o deslocamento da fase contida no seu interior. Para esvaziar a coluna cromatográfica, os passos 1 a 3 são realizados da mesma forma, apenas variando a pressão a ser ajustada. Para esvaziar a coluna cromatográfica, utilizou-se uma pressão de 3000 psi.

O procedimento empregado consiste em completar o reservatório de suspensão com metanol e fechar a sua extremidade superior. Posteriormente, abre a válvula do solvente e coleta a fase estacionária em um béquer. Após remoção da fase estacionária, os passos de 7 a 11 devem ser seguidos.

A coluna, assim como seus acessórios devem ser lavados com água e detergente, além de serem colocados em banho de ultrassom por 10 min, a fim de remover vestígios da fase estacionária e desobstruir os poros do filtro.

3.10 Preparo das fases móveis

A avaliação das colunas cromatográficas preparadas com as fases estacionárias sorvidas e imobilizadas foi realizada utilizando-se a fase móvel metanol:água, em diferentes proporções.

Inicialmente todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram filtrados em uma membrana Durapore®, 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica (GVWP04700, marca Millipore) para eliminar as impurezas sólidas.

Os volumes dos solventes que compõem a FM foram medidos individualmente, com o auxílio de uma proveta e, posteriormente, foram misturados em um frasco de vidro. Após a preparação, as fases móveis foram desgaseificadas em ultrassom por 20 minutos.

Para realização de algumas avaliações cromatográficas e testes de estabilidade, foram utilizadas fases móveis tamponadas, que foram preparadas através da adição do ácido/base conjugada ou base/ácido conjugado em balões volumétricos. O pH das soluções foi ajustado utilizando-se KOH, para tampões básicos, e ácido fosfórico ou ácido trifluoracético, para os tampões ácidos. Após ajuste do pH das soluções aquosas, as soluções foram filtradas e, posteriormente, realizou-se a mistura com o solvente orgânico metanol. A fase móvel tamponada foi então filtrada e desgaseificada em ultrassom, por 20 minutos.

3.11 Condicionamento das colunas

O condicionamento das colunas após o enchimento é uma etapa necessária para eliminar todos os vestígios dos solventes usados no enchimento e para se obter equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel, além de proporcionar repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos analisados.

O condicionamento da coluna, após o enchimento, foi feito sem acoplá-la ao detector, para evitar que partículas provenientes da coluna pudessem obstruir a tubulação de entrada ou de saída do detector ou, principalmente, que contaminasse a cela de detecção. No condicionamento das colunas foram utilizadas as fases móveis na vazão de 0,2 mL/min por, no mínimo, 1 hora antes da realização das análises cromatográficas.

3.12 Caracterização cromatográfica das fases sorvidas e imobilizadas

As fases sorvidas com carga copolimérica de 40%, 50% e 55% foram avaliadas cromatograficamente (cromatógrafo Shimadzu modelo B), com a utilização da Mistura Teste 1 (MT-1), constituída por uracila, benzonitrila (40 mg/L), benzeno (2 g/L), tolueno (2 g/L) e naftaleno (100 mg/L), e a Mistura Teste 2 (MT-2), constituída por uracila, fenol (200 mg/L), N,N-dimetilanilina (80 mg/L), naftaleno (60 mg/L) e acenafteno (200 mg/L).

A mistura teste 1 foi utilizada para avaliar a seletividade e a hidrofobicidade das fases estacionárias, sendo constituída por compostos neutros polares (benzonitrila) e apolares (benzeno, tolueno e naftaleno). A mistura teste 2, por sua vez, foi utilizada para avaliar a acidez e a polaridade das fases, uma vez que é constituída por compostos ácidos (fenol), básicos (N,N-dimetilanilina) e neutros (naftaleno e acenafteno). Essas misturas testes foram preparadas em fase móvel MeOH:H₂O 50:50 (v/v) e armazenadas em geladeira. A Figura 22 mostra as estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas teste 1 e 2.

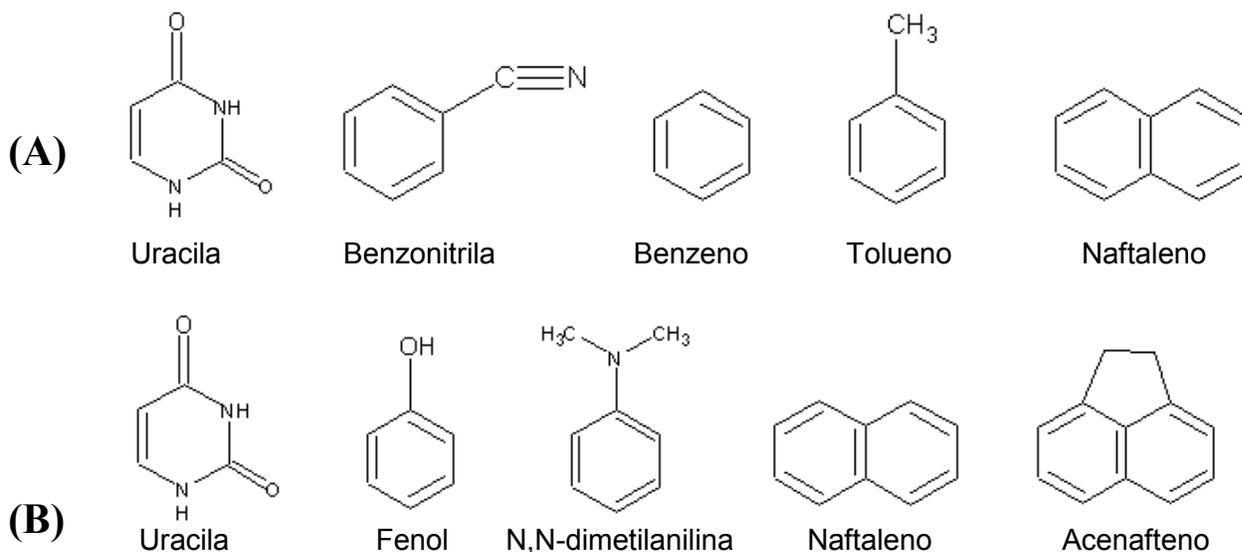


Figura 22: Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes: (A) MT-1: uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; e (B) MT-2: uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno.

Após definição da melhor carga copolimérica, foram preparadas três fases estacionárias imobilizadas a diferentes condições de potência e tempo, sendo 720 W

por 70 min, 620 W por 80 min e 520 W por 90 min, a fim de selecionar as condições de imobilização que proporcionassem uma FE que apresentasse parâmetros cromatográficos dentro da faixa aceita na literatura² e elevada eficiência. Essas condições de análise foram definidas com base nos estudos realizados por Fioravanti²⁰, que desenvolveu uma FE a partir da imobilização por micro-ondas do polímero poli(metilfenilsiloxano) sobre suporte de sílica. As fases imobilizadas foram avaliadas através das MT-1 e MT-2, utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu, modelo A.

Dentre as fases imobilizadas analisadas, selecionou-se a FE que apresentou melhor desempenho cromatográfico para ser utilizada como precursora para o estudo da otimização das condições de imobilização por micro-ondas.

As fases sorvidas e imobilizadas foram analisadas à temperatura de 25 °C, utilizando-se detector UV-Vis a 254 nm e volume de injeção da amostra de 5 µL, empregando-se três diferentes composições da FM MeOH:H₂O, 70:30, 60:40 e 50:50 (v/v). O composto uracila foi empregado como composto não retido (para obtenção do t_M) e a vazão utilizada foi de 0,4 mL/min, sendo que a vazão ótima foi determinada posteriormente através da curva de van Deemter¹.

Os parâmetros cromatográficos calculados na avaliação das fases estacionárias preparadas foram a eficiência da coluna (N/m) para o pico do naftaleno, o fator de assimetria a 10% da altura do pico (As 10%) para os compostos naftaleno e N,N-dimetilanilina, o fator de retenção (k) para o pico do naftaleno e a resolução (Rs) entre os picos do tolueno e naftaleno.

Após otimização das condições de imobilização por micro-ondas, a fase que apresentou melhores parâmetros cromatográficos foi avaliada através de diferentes misturas teste descritas na literatura e em termos de aplicabilidade e estabilidade química.

3.13 Avaliação cromatográfica da fase estacionária otimizada

3.13.1 Mistura teste de Engelhardt e Jungheim

A MT desenvolvida por Engelhardt e Jungheim⁵¹ é composta por uracila, anilina (15 mg/L), fenol (20 mg/L), N,N-dimetilanilina (20 mg/L), tolueno (30 mg/L) e etilbenzeno (30 mg/L), sendo analitos hidrofóbicos, ácidos e básicos, utilizados para avaliar a

seletividade hidrofóbica e a atividade silanofílica da FE. A mistura foi analisada em FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v), utilizando-se vazão otimizada de 0,3 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção UV-Vis a 254 nm.

A Figura 23 apresenta as estruturas químicas dos compostos constituintes desta mistura teste.

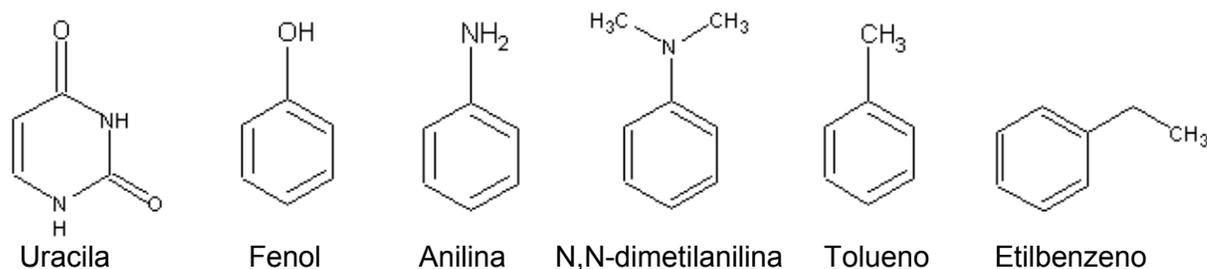


Figura 23: Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste de Engelhardt e Jungheim.

A atividade silanofílica é avaliada pelo fator de assimetria e pela ordem de eluição dos compostos básicos e ácidos. Engelhardt e Jungheim notaram que fases estacionárias com baixa atividade silanofílica exibem um comportamento semelhante, sendo que a eluição da anilina ocorre antes do fenol podendo, em alguns casos, até coeluir; a razão entre o fator de assimetria da anilina e do fenol é sempre menor que 1,3; e a N,N-dimetilanilina elui antes do tolueno. Por sua vez, a seletividade hidrofóbica é analisada pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH_2} = k_{EB}/k_{Tolueno}$), que se diferem por um grupo metil, fornecendo informações sobre a hidrofobicidade da FE.

3.13.2 Misturas teste de Szabó e Csató

Os pesquisadores Szabó e Csató⁵² realizaram a separação de compostos de uma MT a partir de fases estacionárias do tipo fenilpolissiloxanos, a fim de avaliar as características de retenção dos diferentes polímeros fenil utilizados no preparo das fases estacionárias.

A mistura teste A constituída por uracila, fenol (200 mg/L), m-cresol (3 g/L), acetofenona (3 g/L), benzoato de metila (3 g/L), tolueno (2 g/L), p-xileno (3 g/L) e propilbenzeno (2 g/L), substâncias hidrofóbicas e polares, foi analisada em FM

MeOH:H₂O 60:40 (v/v) a uma vazão de 0,3 mL/min, detecção UV-Vis a 254 nm e à 25 °C.

A fim de avaliar a separação de compostos aromáticos, a mistura teste B foi analisada, contendo uracila, benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno e butilbenzeno, todos a uma concentração de 2 g/L, utilizando-se FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v), vazão de 0,3 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

A Figura 24 mostra as estruturas químicas dos compostos constituintes das misturas teste A e B de Szabó e Csató.

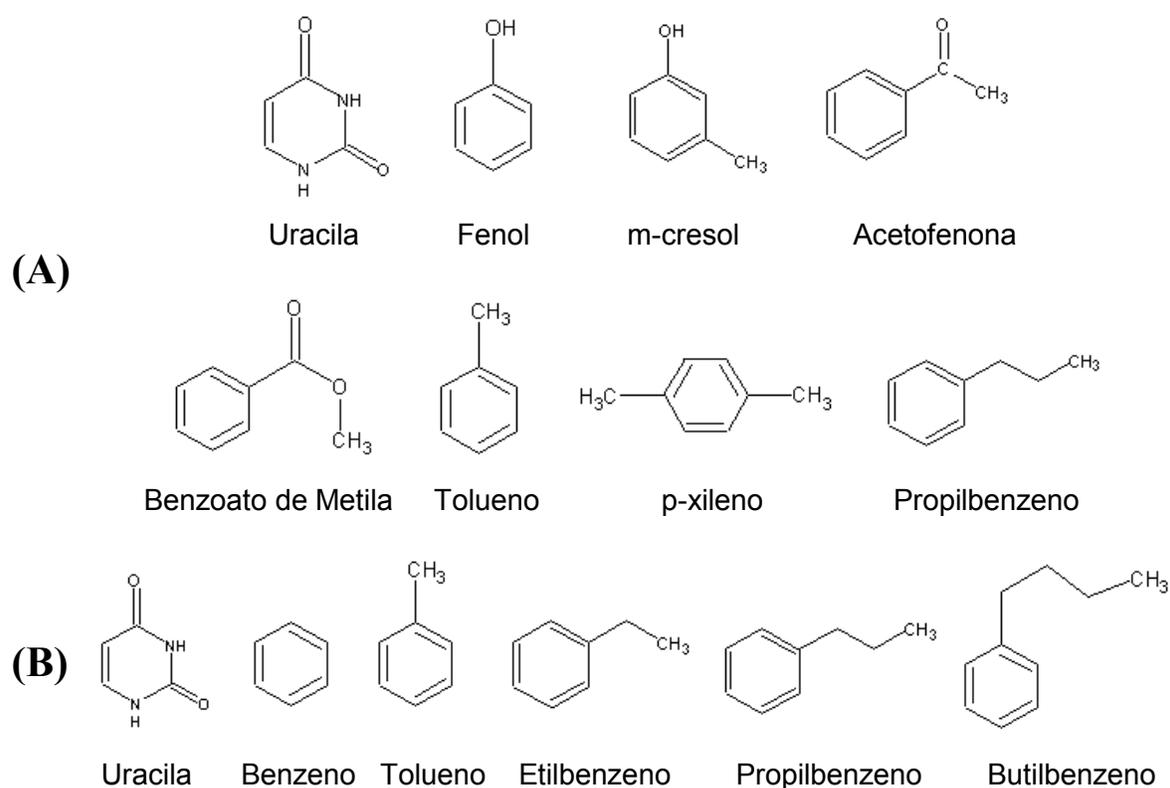


Figura 24: Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes de Szabó e Csató: (A) MT A: uracila, fenol, m-cresol, acetofenona, benzoato de metila, tolueno, p-xileno e propilbenzeno; (B) MT B: uracila, benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno e butilbenzeno.

3.13.3 Mistura teste de Neue

Neue e colaboradores⁵³ desenvolveram uma mistura de compostos ácidos, básicos e neutros, analisada em FM neutra, capaz de avaliar a atividade silanofílica, hidrofóbica e interações eletrostáticas da FE. A MT é composta por uracila,

butilparabeno (20 mg/L), dipropilftalato (340 mg/L), naftaleno (60 mg/L), acenafteno (200 mg/L), propranolol (400 mg/L) e amitriptilina (100 mg/L) e foi analisada em FM MeOH:20 mmol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,0, 65:35 (v/v), vazão de 0,3 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

Uma fase móvel tamponada em pH 7,0 foi utilizada, a fim de suprimir algumas das interações entre os grupos silanóis residuais e os compostos básicos, uma vez que analitos fortemente básicos são utilizados para avaliar a atividade silanofílica da FE.

O tampão foi preparado pesando-se 0,842 g de KH_2PO_4 e 0,664 g de K_2HPO_4 , solubilizados em água deionizada e adicionados a um balão volumétrico de 500 mL. O pH desta solução foi medido e ajustado utilizando-se solução de KOH.

A Figura 25 mostra as estruturas químicas dos compostos constituintes desta mistura.

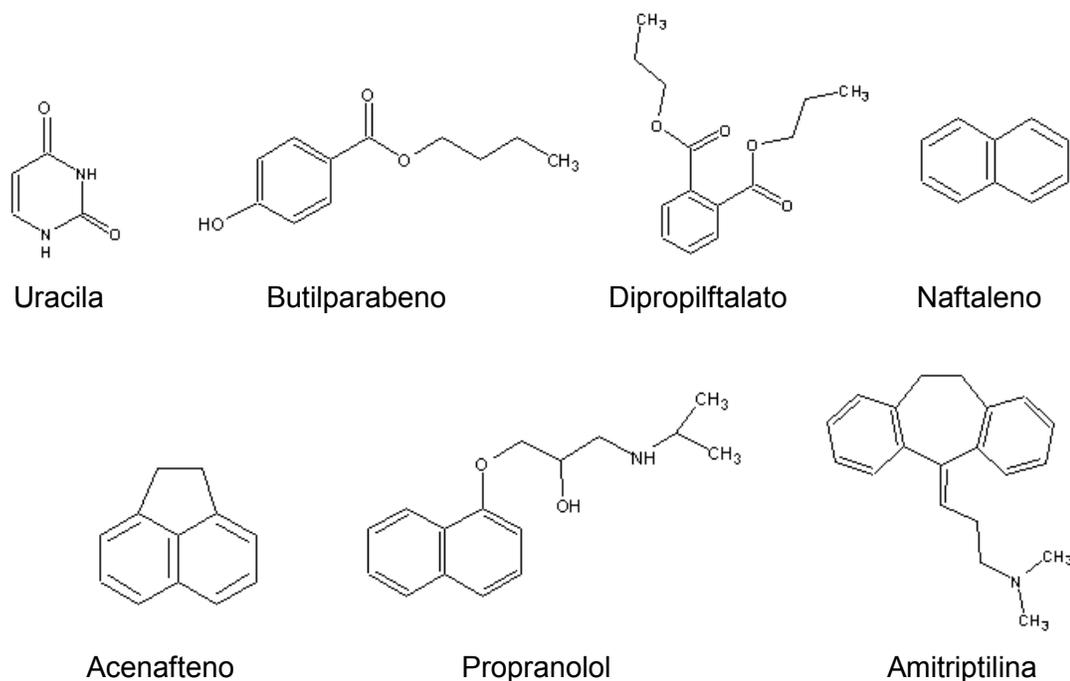


Figura 25: Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste de Neue e colaboradores.

3.13.4 Misturas teste de Tanaka

O protocolo de Tanaka e colaboradores⁵⁴ é um método de caracterização de fases estacionárias reversas à base de sílica, desenvolvido para avaliar propriedades como a hidrofobicidade, seletividade estérica, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas

entre diferentes tipos de analitos e a FE. Quatro misturas teste são empregadas (A, B, C e D), sendo que cada uma possui uma composição de FM específica. Todas as misturas foram analisadas a temperatura ambiente, a uma vazão de FM de 0,3 mL/min e detecção UV-Vis a 254 nm.

A Figura 26 apresenta as estruturas químicas das substâncias presentes nas misturas teste de Tanaka.

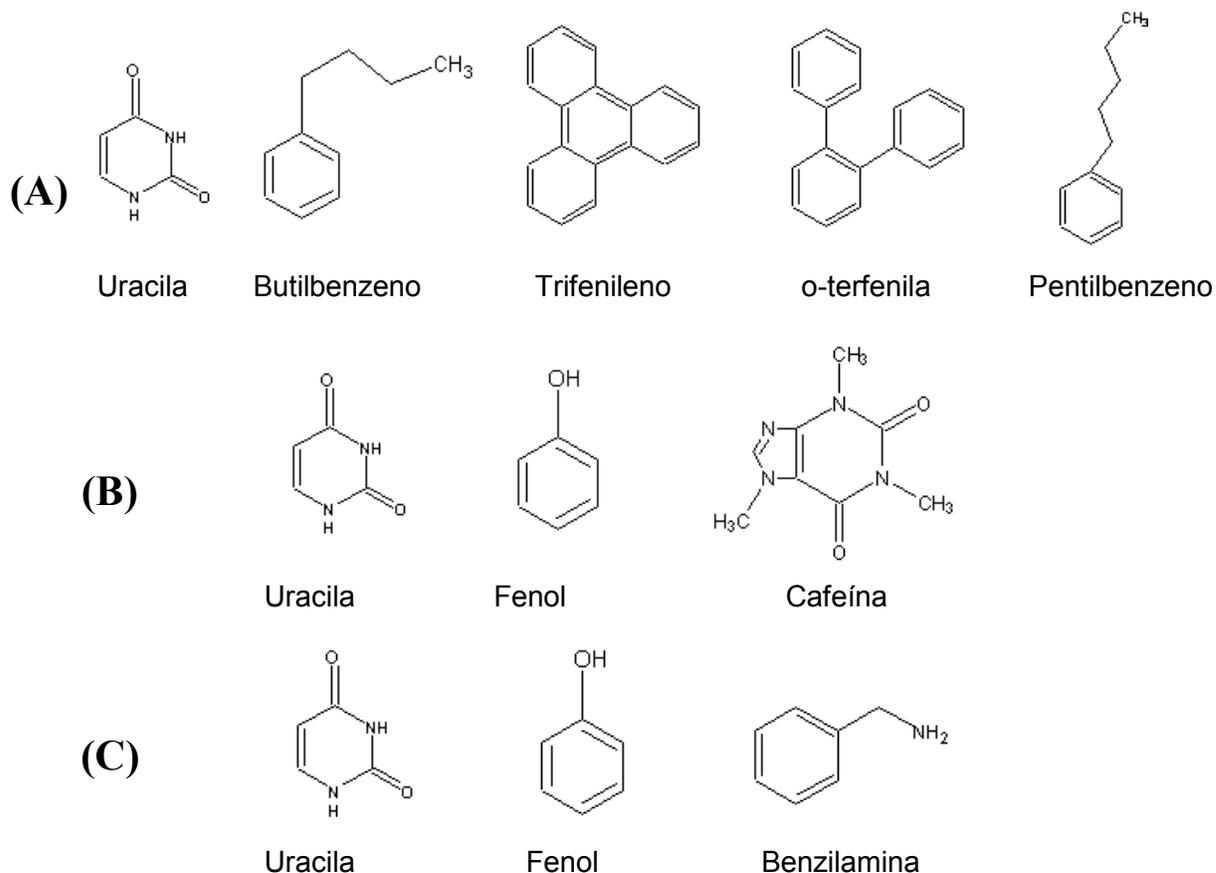


Figura 26: Representação das estruturas químicas dos compostos presentes nas misturas testes de Tanaka: (A) MT A: uracila, butilbenzeno, trifenileno, o-terfenila e pentilbenzeno; (B) MT B: uracila, fenol e cafeína; e (C) MT C e MT D: uracila, fenol e benzilamina.

A mistura teste (MT A) é composta por uracila, butilbenzeno (2 g/L), pentilbenzeno (2 g/L), o-terfenila (2 g/L) e trifenileno (3 g/L), e utiliza uma FM MeOH:H₂O 80:20 (v/v) para avaliar a seletividade hidrofóbica, medida pela razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno ($\alpha_{CH_2} = k_{PB}/k_{BB}$); a hidrofobicidade (k_{PB}), medida a partir do fator de retenção do pentilbenzeno, que reflete o recobrimento da FE; a seletividade estérica da FE, medida pela razão entre os fatores de retenção do

trifenileno e da o-terfenila ($\alpha_{T/O} = k_T/k_O$), que é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e pela funcionalidade do polímero; e a seletividade aromática^{10,55}, obtida através da razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e da o-terfenila ($\alpha_{PB/O} = k_{PB}/k_O$), indicando a capacidade da FE em realizar interações π - π com compostos aromáticos.

A MT B, composta por uracila, cafeína (400 mg/L) e fenol (200 mg/L), analisada em FM MeOH:H₂O 30:70 (v/v), é empregada para avaliar a capacidade de ligação de hidrogênio com a FE, através da razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/F} = k_C/k_F$), sendo uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra.

A MT C de Tanaka é composta por uracila, benzilamina (pKa = 9,3, 300 mg/L) e fenol (pKa = 9,9, 400 mg/L), sendo analisada em FM MeOH:20 mmol/L de K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6, 30:70 (v/v) e é utilizada para avaliar as interações eletrostáticas totais com a FE, através da razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6 = k_B/k_F), estimando também a atividade silanofílica total da FE.

O tampão fosfato a pH 7,6 foi preparado pesando-se 0,394 g de KH₂PO₄ e 1,238 g de K₂HPO₄, que foram solubilizados em água e adicionados em um balão volumétrico de 500 mL. O pH desta solução foi medido e ajustado com solução de KOH.

A MT D, por sua vez, composta por uracila, benzilamina (300 mg/L) e fenol (400 mg/L), é analisada com FM MeOH:20 mmol/L de KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7, 30:70 (v/v), com o objetivo de avaliar as interações eletrostáticas em meio ácido, que são medidas pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7 = k_B/k_F) e estima a acidez dos grupos silanóis residuais.

O tampão fosfato a pH 2,7 foi preparado pesando-se 1,078 g de KH₂PO₄, solubilizando-se em água deionizada e adicionado a um balão volumétrico de 500 mL, juntamente com 0,121 mL de H₃PO₄. O pH desta solução foi medido e ajustado utilizando-se o ácido fosfórico.

A uracila é utilizada em todas as misturas teste, a fim de definir o t_M , tempo necessário para que a FM passe através de todo o sistema cromatográfico, essencial para o cálculo de alguns parâmetros cromatográficos.

3.14 Avaliação da aplicabilidade das fases estacionárias e comparação com colunas comerciais

A aplicabilidade da FE imobilizada a 540 W por 80 min foi avaliada através da separação de compostos com características ácidas e básicas, como agrotóxicos e fármacos, assim como através da separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que são compostos neutros e apolares.

O desempenho da fase estacionária preparada foi comparado com o de duas colunas comerciais, sendo uma Fenil-Hexil Zorbax[®] Eclipse Plus, 5 µm, duplamente capeada, com comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 4,6 mm, comercializada pela Agilent, e outra do tipo C18 Nova Pak[®], 4 µm, capeada, com comprimento de 150 mm e diâmetro interno de 3,9 mm, comercializada pela Waters, para as quais também foram realizadas as separações de fármacos, agrotóxicos e HPA.

Os compostos constituintes destas misturas foram analisados individualmente, para obtenção dos tempos de retenção de cada composto e, posteriormente, preparou-se uma mistura dos compostos em FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), exceto para a mistura de fármacos (MT F2), que foi preparada em FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7 (50:50 v/v).

3.14.1 Separação de agrotóxicos

Uma mistura de agrotóxicos, contendo imazaquim (ácido fraco, 75 mg/L), cianazina (ácido fraco, 36 mg/L), atrazina (base fraca, 64 mg/L), diurom (neutro, 52 mg/L) e linurom (neutro, 108 mg/L), foi analisada em FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), temperatura ambiente, detecção UV-Vis a 254 nm e vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais.

Estes agrotóxicos são muito utilizados na agricultura brasileira, principalmente em culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, entre outros, e possuem grande impacto ambiental, podendo afetar as fontes de águas subterrâneas⁵⁶.

As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 27.

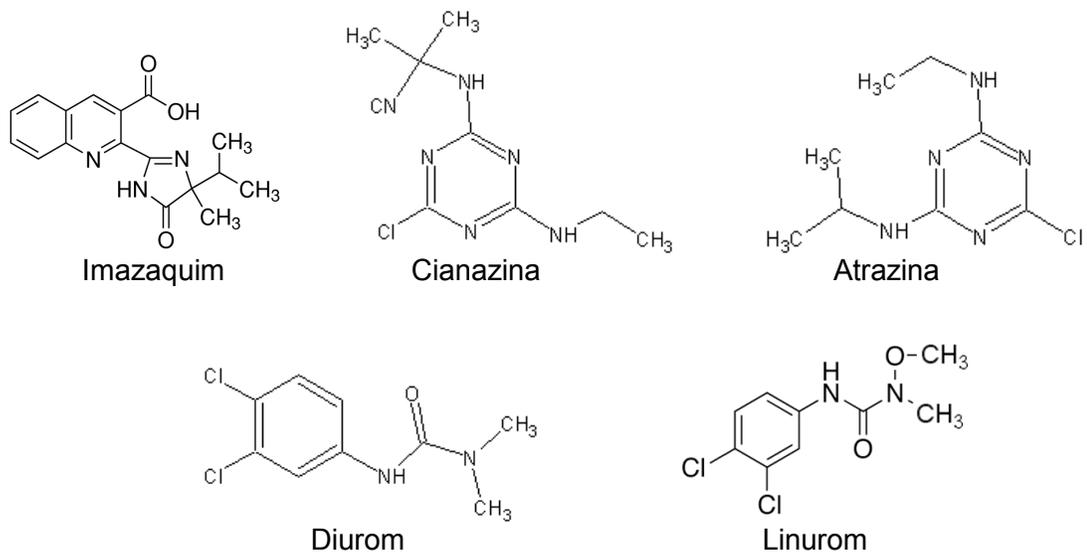


Figura 27: Estruturas químicas dos agrotóxicos estudados: imazaquim, cianazina, atrazina, diurom e linurom.

3.14.2 Separação de fármacos

Analisou-se uma mistura preparada com padrões de fármacos de elevada pureza, ácido acetilsalicílico (AAS, 30 mg/L), paracetamol (ácido fraco, 16 mg/L) e cafeína (base, 18 mg/L), frequentemente presentes em analgésicos. Esta mistura (MT F1) foi analisada em FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais, temperatura ambiente e detecção a 254 nm.

A Figura 28 apresenta as estruturas químicas dos fármacos AAS, paracetamol e cafeína.

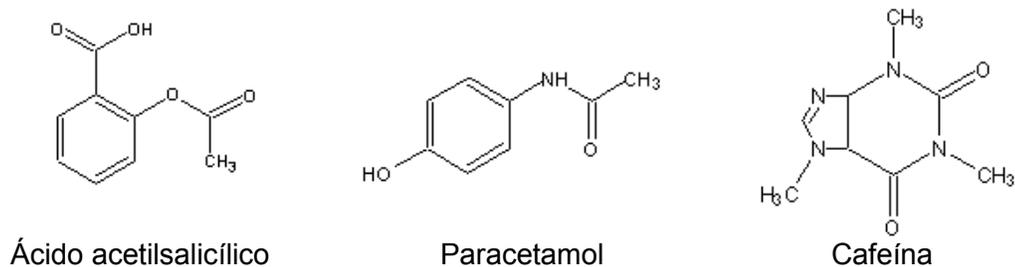


Figura 28: Estruturas químicas dos fármacos estudados na MT F1: AAS, paracetamol e cafeína.

Também, realizou-se a análise de um fármaco, disponível comercialmente, que possui em sua composição 200 mg de AAS, 150 mg de paracetamol e 50 mg de

caféina e é utilizado como analgésico e antipirético. A mistura teste deste fármaco foi preparada a partir da dissolução de 0,4940 g do comprimido em 50 mL de FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), seguido de diluição de 1 mL da solução inicial em 80 mL de FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), obtendo-se uma solução de concentração aproximada de 120 mg/L do fármaco. A mistura foi filtrada em filtro de seringa Millex[®] de 0,22 µm de poro. Dentre os excipientes presentes no fármaco, tem-se celulose microcristalina, amido de milho, óleo de rícino e óxido de ferro amarelo. As condições cromatográficas de análise foram as mesmas utilizadas nas misturas dos fármacos padrões.

Outra mistura de fármacos (MT F2) foi analisada, contendo levofloxacina hemiidratada (antibiótico, 34 mg/L), bromidrato de dextrometorfano (antitussígeno, 100 mg/L), diazepam (tranquilizante, 40 mg/L) e hidrocloretos de amitriptilina (50 mg/L) e nortriptilina (27 mg/L), que são antidepressivos. Esta mistura foi analisada em FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7 (50:50 v/v), a uma vazão de 0,3 mL/min na coluna preparada no laboratório e 1,0 mL/min nas colunas comerciais e detectada por UV-Vis a 220 nm à 25 °C. A Figura 29 mostra as estruturas químicas dos fármacos analisados nesta mistura.

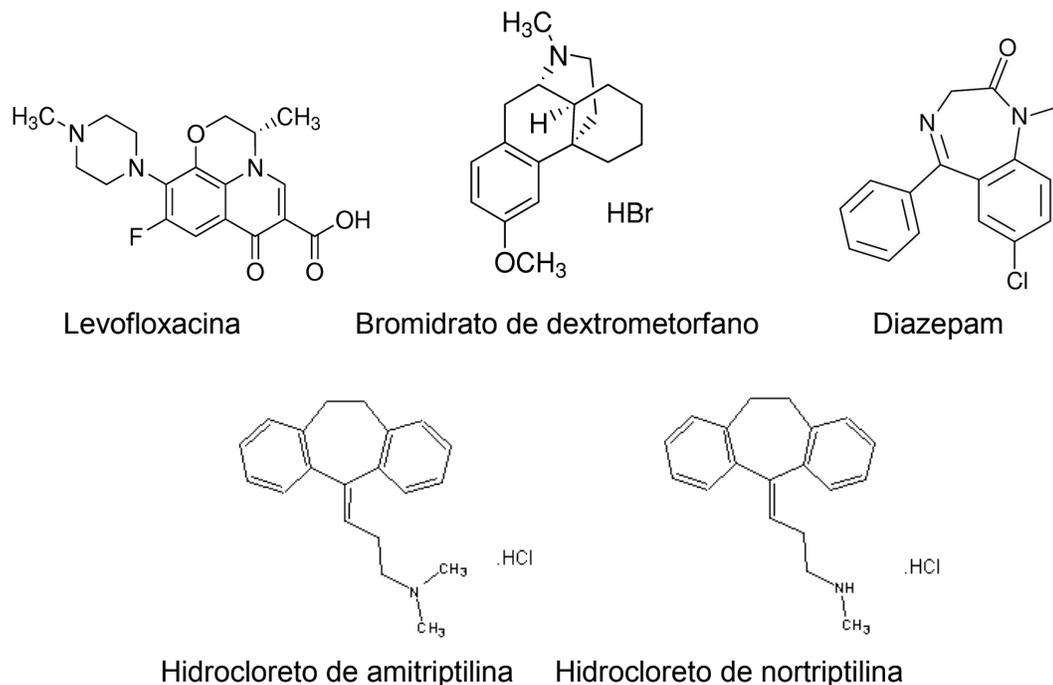


Figura 29: Estruturas químicas dos fármacos estudados na MT F2: levofloxacina, bromidrato de dextrometorfano, diazepam, hidrocloreto de amitriptilina, hidrocloreto de nortriptilina.

3.14.3 Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi analisada, contendo naftaleno (90 mg/L), acenaftileno (50 mg/L), bifenil (70 mg/L), fluoreno (70 mg/L), fenantreno (65 mg/L), antraceno (100 mg/L), fluoranteno (95 mg/L), pireno (120 mg/L) e trifenileno (50 mg/L), além do benzeno (100 mg/L). Esta mistura foi analisada em temperatura ambiente, detecção UV-Vis a 254 nm, vazão de 0,3 mL/min e FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v) para a coluna preparada no laboratório, e em FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL/min, para as colunas comerciais.

A Figura 30 apresenta as estruturas químicas dos compostos presentes nesta mistura.

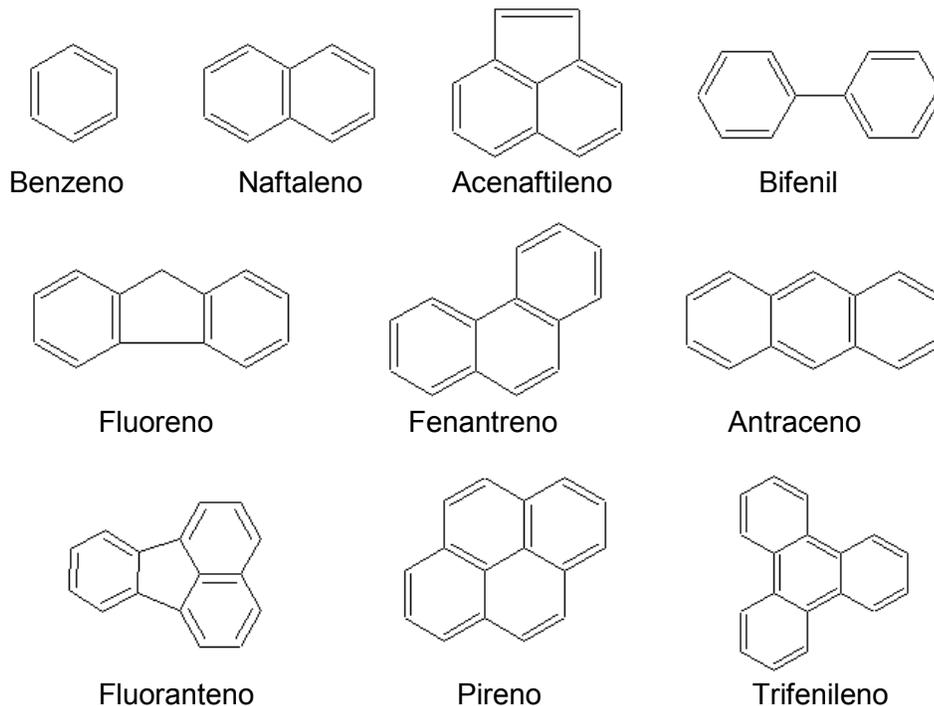


Figura 30: Representação das estruturas químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados: naftaleno, acenaftileno, bifenil, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e trifenileno, assim como a do benzeno.

3.15 Avaliação da estabilidade química da FE otimizada

A estabilidade das fases estacionárias à base de sílica está diretamente relacionada com o tipo e pureza do suporte cromatográfico, assim como com a natureza

da fase estacionária líquida sorvida e/ou imobilizada sobre o suporte. A estabilidade também varia dependendo das condições de análise, como pH da fase móvel, temperatura de análise e tipo e concentração do modificador orgânico utilizado na FM⁵⁷.

A fase estacionária sorvida com CCP de 50% e da FE imobilizada a 540 W por 80 minutos foram avaliadas em termos de estabilidade química^{6,58,59}, realizando-se a passagem de fases móveis alcalinas e ácidas, continuamente, através das colunas cromatográficas e avaliando-se periodicamente os parâmetros cromatográficos, como eficiência, fator de assimetria a 10% da altura do pico e fator de retenção para um analito teste presente em uma MT.

A estabilidade das fases frente à condições alcalinas foi realizada utilizando-se FM MeOH:50 mmol/L K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm e a MT-2, injetada a cada 30 minutos. Para a avaliação dos parâmetros cromatográficos foi utilizado o naftaleno como analito teste.

A estabilidade das fases frente à condições ácidas foi realizadas utilizando-se FM MeOH:0,1% ácido trifluoracético pH 1,7 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm. Como analito teste foi utilizado o tolueno, presente na MT-1, que foi injetada na coluna a cada 30 minutos.

Antes do início das avaliações de estabilidade, as colunas cromatográficas foram condicionadas por um período de 1 hora, nas respectivas fases móveis de análise.

A estabilidade química das fases foi determinada em termos do número de volumes de coluna eluídos, sendo que cada volume de coluna (V_{col}) corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços internos da coluna cromatográfica, que não são ocupados pelo recheio cromatográfico. O volume de coluna é determinado através do produto entre a vazão de análise e o tempo de retenção de um soluto não retido, no caso, a uracila, conforme a Equação 10.

$$V_{col} = F \cdot t_M \quad (10)$$

sendo:

F: vazão da FM de análise;

t_M : tempo de retenção de um composto não retido.

O valor de V_{col} calculado para as fases estacionárias foram de 0,52 mL para a utilização da fase móvel básica a pH 10 e de 0,62 mL para a utilização da FM ácida, uma vez que os tempos de retenção da uracila foram, respectivamente, 1,04 e 1,24 minutos.

Convém ressaltar que as condições de análise da estabilidade são drásticas, com o objetivo de acelerar a deterioração e o colapso da fase estacionária, possibilitando a realização de avaliações mais rapidamente e com menor gasto de fase móvel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do suporte cromatográfico

4.1.1 Caracterização por difratometria de raios X

A sílica porosa pode-se apresentar na forma amorfa ou cristalina e, a fim de definir sua cristalinidade, realizou-se uma análise por difratometria de raios X.

A análise foi realizada utilizando-se suporte plano de silício (“background zero”). O difratograma obtido está representado na Figura 31.

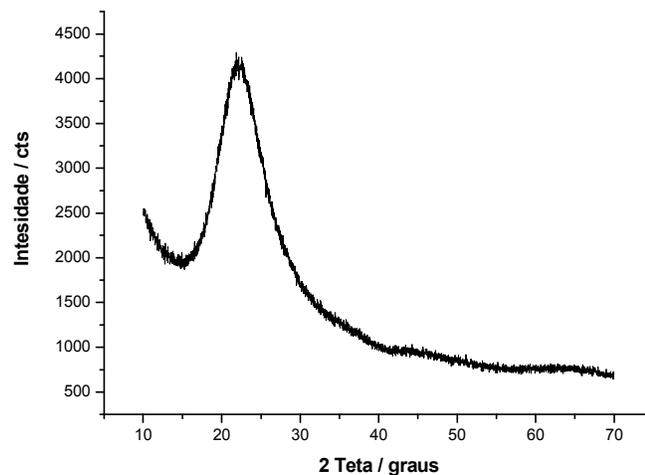


Figura 31: Difratograma da sílica porosa Kromasil®, obtido com a utilização de suporte plano de silício.

A partir do perfil do difratograma obtido, tem-se que a sílica utilizada como suporte cromatográfico possui característica amorfa, uma vez que não apresenta padrão de difração definido, apresentando apenas banda característica de material não-cristalino.

4.1.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho da sílica nua, obtido através do método da pastilha de KBr (1% m/m), está mostrado na Figura 32.

Analisando-se o espectro de absorção no infravermelho da sílica nua, pode-se observar a presença de bandas de absorção em 3458, 1115 e 1640 cm^{-1} .

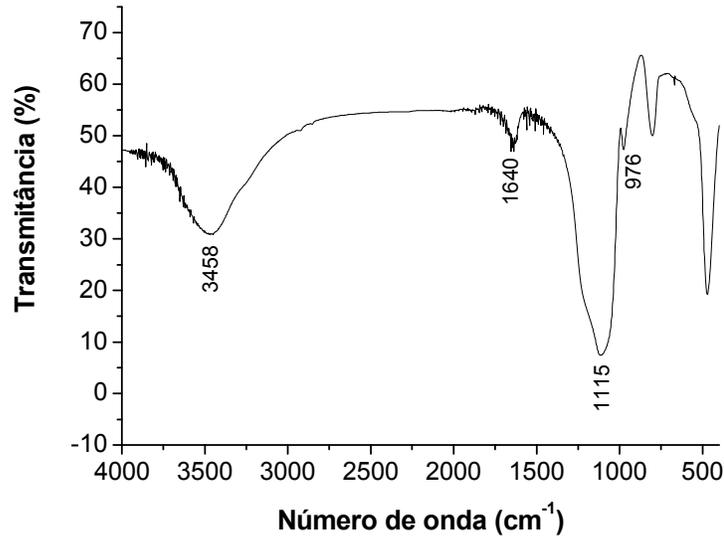


Figura 32: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amostra de sílica nua Kromasil®, utilizando-se o método de pastilha de KBr.

As bandas observadas em 3458 e 1640 cm^{-1} referem-se às vibrações das moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica, sendo atribuídas, respectivamente, ao estiramento O-H das moléculas de água que interagem por ligações de hidrogênio e às deformações angulares simétricas no plano (tesoura) das moléculas. Além disso, a banda de absorção observada a 3458 cm^{-1} também se refere ao estiramento O-H dos diferentes grupos silanóis presentes na superfície da sílica (terminais, geminais e livres)⁶⁰.

A banda de absorção em 1115 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações siloxanos Si-O-Si, enquanto o ombro observado a 976 cm^{-1} , refere-se ao estiramento Si-O, relacionado aos grupos silanóis livres⁶¹.

4.1.3 Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros

Para obterem-se as propriedades de volume de poro, diâmetro de poro e área superficial específica do suporte cromatográfico, utilizaram-se as técnicas de BET e BJH.

Os resultados obtidos para a sílica nua foram: área superficial de 295 m^2/g , volume de poros de 0,85 cm^3/g e diâmetro de poros médio de 11,5 nm.

4.1.4 Caracterização por RMN de ^{29}Si

A Figura 33 apresenta o espectro de RMN de ^{29}Si obtido para a sílica nua.

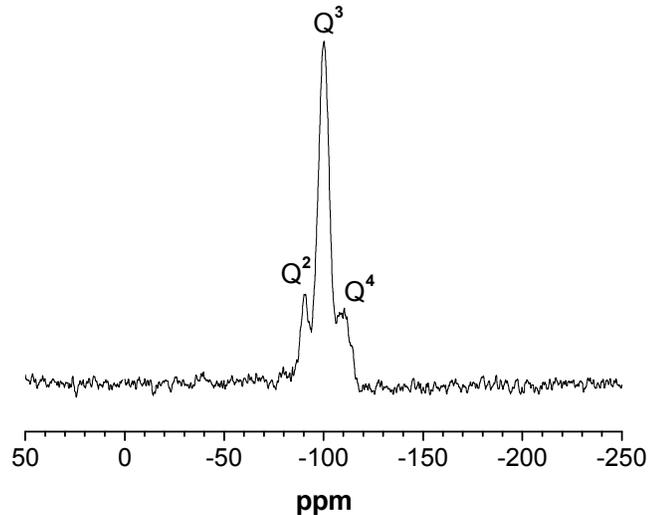


Figura 33: Espectro de RMN de ^{29}Si para a SiO_2 pura.

Analisando-se o espectro de RMN de ^{29}Si da sílica, observa-se a presença de três picos, localizados em deslocamentos químicos de -91 ppm, -100 ppm e -110 ppm, que são atribuídos, respectivamente, ao deslocamento químico dos silanóis geminais (Q^2), ao deslocamento químico dos silanóis livres e vicinais (Q^3) e ao deslocamento químico das ligações siloxanos (Q^4), indicando que o suporte cromatográfico possui quatro diferentes tipos de silício em sua estrutura.

A razão entre a intensidade dos picos Q^3 e Q^4 é uma medida comparativa entre a quantidade de grupos silanóis livres na superfície da sílica e a de grupos siloxanos⁶². No caso da sílica nua, observa-se que o pico Q^3 possui maior intensidade, sendo a razão Q^3/Q^4 igual a 4,9, aproximadamente, indicando que a sílica possui elevado número de silanóis em sua superfície. Esse comportamento é esperado, uma vez que a presença destes grupos é fundamental para a síntese das fases estacionárias, pois atuam como sítios reacionais para interação com o copolímero.

4.1.5 Caracterização por termogravimetria

Os termogramas da sílica nua foram obtidos sob atmosfera oxidante e inerte, com o objetivo de avaliar a sua estabilidade térmica. Os termogramas, assim como a derivada da massa de sílica nua em função da temperatura, estão representados na Figura 34.

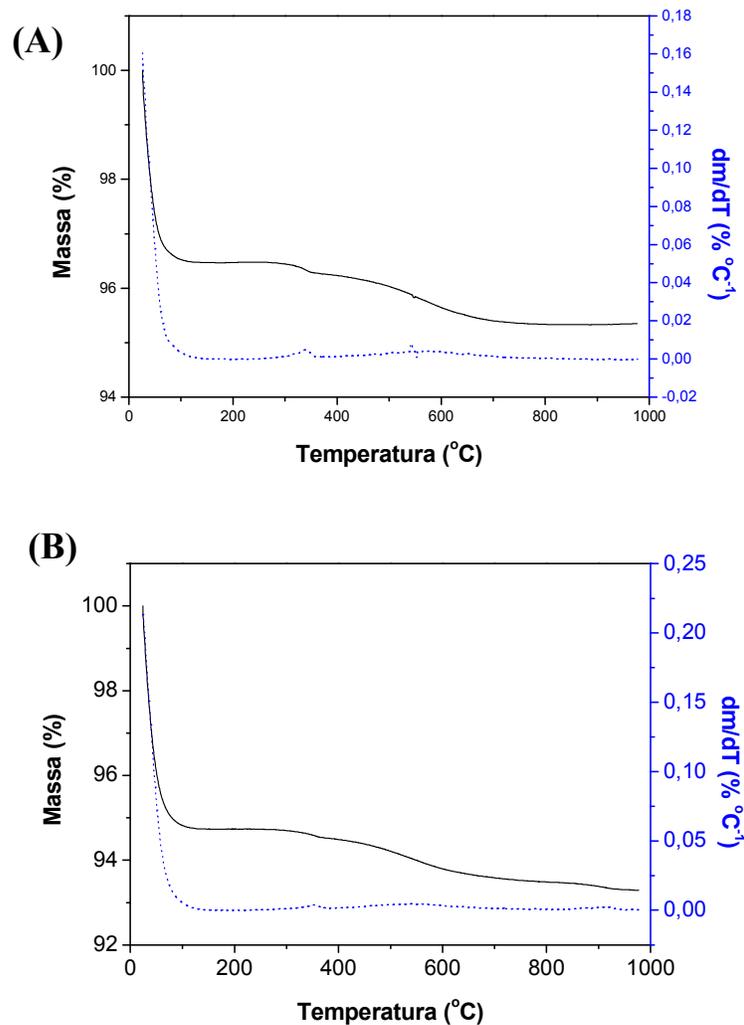


Figura 34: Termogramas obtidos para a sílica nua em: (A) atmosfera oxidante; e (B) atmosfera inerte.

Como se pode observar pelos termogramas da Figura 34, tem-se que a sílica exibe comportamento semelhante, tanto em atmosfera oxidante quanto inerte. Basicamente, o comportamento térmico da sílica é caracterizado pelos processos de

desidratação e desidroxilação¹⁰. Em relação à desidratação, tem-se que as moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica são eliminadas até aproximadamente 120 °C. Acima desta temperatura e até cerca de 600 °C, ocorre a eliminação das moléculas de água fortemente adsorvidas na superfície da sílica.

Acima de 600 °C, inicia-se o processo de desidroxilação, havendo perda dos grupos hidroxilas da sílica. Portanto, tem-se que a sílica possui elevada estabilidade térmica, em ambas as atmosferas oxidante e inerte.

4.2 Caracterização físico-química da fase estacionária líquida

4.2.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho do copolímero PFPMS foi obtido pelo método de transmissão, utilizando-se janela de NaCl e está representado na Figura 35.

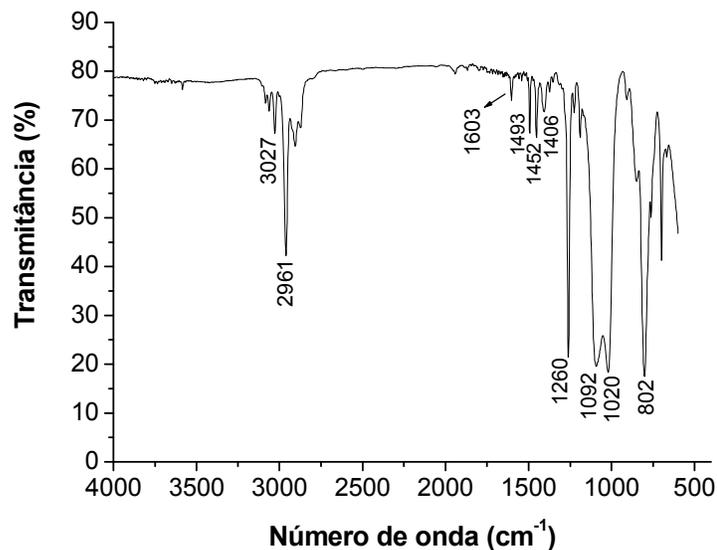


Figura 35: Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amostra do copolímero PFPMS, utilizando-se o método de transmissão, com janela de NaCl.

Analisando-se o espectro de absorção no infravermelho do copolímero PFPMS na Figura 35, pode-se observar a presença de bandas de absorção intensas entre 800 e 1300 cm^{-1} e na região de 3000 cm^{-1} .

As bandas intensas presentes no intervalo de 1000 a 1100 cm^{-1} são atribuídas às ligações siloxanos Si-O-Si.

A banda localizada a 3027 cm^{-1} , e um pouco acima, são atribuídas ao estiramento da ligação =C-H do anel aromático. Na região de 600 a 900 cm^{-1} estão localizadas bandas que podem ser atribuídas à deformação angular fora do plano das ligações =C-H do anel aromático. Por sua vez, as bandas localizadas na região de 1400 e 1600 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações C=C do anel aromático. As bandas observadas em 1452 e 1493 cm^{-1} também podem ser atribuídas à deformação angular C-H dos grupos metileno ($\text{-CH}_2\text{-}$) e metil (-CH_3).

A banda localizada em 2961 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-H dos grupos metil e metileno, enquanto que a banda localizada em 1260 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação angular C-H dos grupos metil e metileno.

4.2.2 Termogravimetria

Os termogramas do copolímero PFPMS foram obtidos sob atmosfera oxidante e inerte, com o objetivo de avaliar sua estabilidade térmica. Os termogramas, assim como a derivada da massa do copolímero em função da temperatura, estão representados na Figura 36.

Como se pode observar pelo termograma da Figura 36A, tem-se que em atmosfera oxidante, o copolímero é estável até à temperatura aproximada de $200\text{ }^\circ\text{C}$. Com isso, tem-se que na imobilização por micro-ondas, que é realizada sob atmosfera oxidante, pode-se empregar, no máximo, esta temperatura. Após $200\text{ }^\circ\text{C}$, inicia-se a etapa de decomposição do copolímero até à temperatura de $700\text{ }^\circ\text{C}$, em diferentes etapas, nas quais há a decomposição da cadeia polimérica, restando apenas o dióxido de silício, que se decompõe em temperaturas acima de $1000\text{ }^\circ\text{C}$.

Analisando-se o termograma obtido sob atmosfera inerte, Figura 36B, tem-se que o copolímero é estável até aproximadamente $300\text{ }^\circ\text{C}$, sendo que entre $300\text{ }^\circ\text{C}$ e $700\text{ }^\circ\text{C}$ ocorre a decomposição da cadeia polimérica. Com isso, tem-se que o copolímero possui maior estabilidade sob atmosfera inerte, permitindo o emprego de maiores temperaturas em sistemas operados sob esta atmosfera.

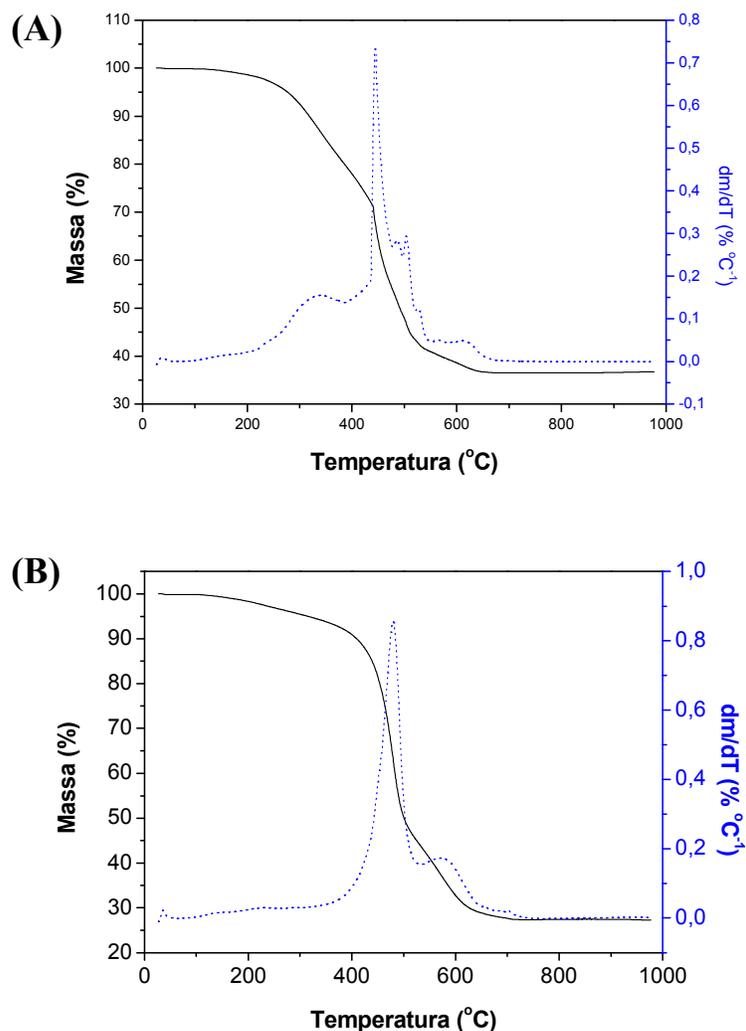


Figura 36: Termogramas obtidos para o copolímero PFPMS em: (A) atmosfera oxidante; e (B) atmosfera inerte.

4.3 Preparação das fases estacionárias

4.3.1 Estudo da sorção do copolímero sobre a sílica

A Figura 37 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise das fases estacionárias preparadas com cargas copoliméricas de 40%, 50% e 55%, em diferentes composições de FM MeOH:H₂O, com o objetivo de avaliar a melhor carga copolimérica a ser utilizada na preparação das fases e a composição mais adequada de FM para a separação dos analitos da MT-1 e MT-2 pelas fases estacionárias Si(PFPMS).

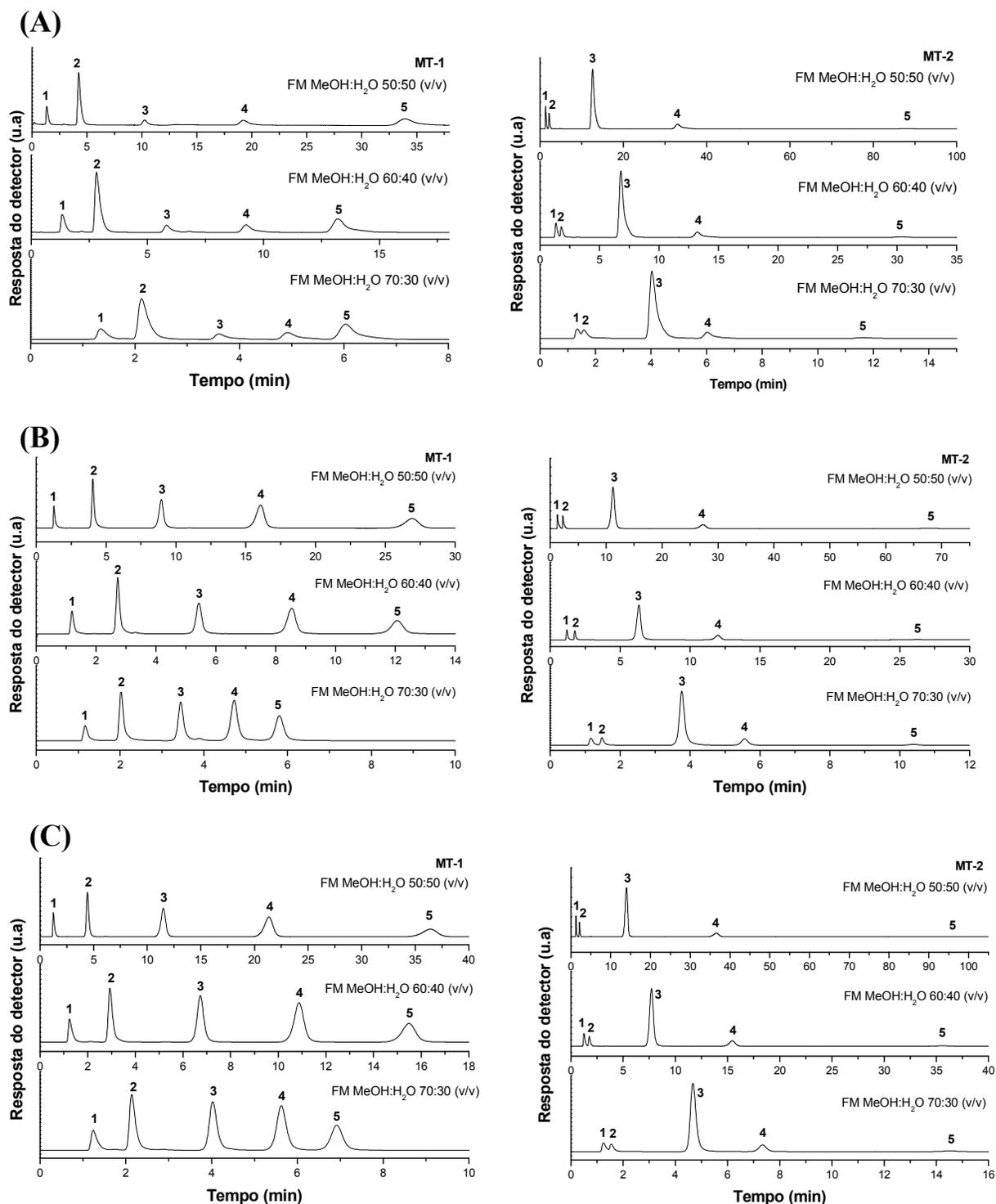


Figura 37: Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias sorvidas com diferentes cargas copoliméricas, em diferentes composições de FM MeOH:H₂O, utilizando-se as MT-1 e MT-2: (A) FE com CCP de 40%; (B) FE com CCP de 50%; e (C) FE com CCP de 55%. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos nas análises destas fases estacionárias, utilizando-se a MT-1 e a MT-2, assim como as porcentagens de carbono obtidas por análise elementar das fases sorvidas.

Tabela 1: Parâmetros cromatográficos obtidos para as fases estacionárias com diferentes CCP.

Carga copolímero (%)	Composição FM MeOH:H ₂ O (% v/v)	N/m ^a (m ⁻¹)	As 10% ^a	As 10% ^b	k ^{a,c}	Rs ^d	% C
40	50:50	49000	2,2	2,0	24,3	7,5	
40	60:40	51000	2,9	2,6	8,9	4,8	19
40	70:30	36000	2,9	2,9	3,5	2,3	
50	50:50	56000	0,8	1,0	20,3	7,3	
50	60:40	70000	0,9	1,0	9,1	5,5	26
50	70:30	67000	1,0	1,3	4,0	3,2	
55	50:50	54000	0,8	0,8	28,3	7,4	
55	60:40	56000	0,9	1,1	11,5	5,0	19
55	70:30	50000	1,1	1,3	4,6	2,8	

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

Analisando-se os resultados obtidos para as três diferentes cargas copoliméricas, verifica-se que o emprego da fase móvel MeOH:H₂O 50:50 (v/v) resultou em elevado fator de retenção (acima de 20), indicando forte interação dos analitos com a FE e longo tempo de análise.

Em relação à FE sintetizada com CCP de 40%, observa-se fatores de assimetria altos, indicando a presença de caudas, mostrando um recobrimento insuficiente do suporte cromatográfico e muitos silanóis residuais.

Quanto à FE com CCP de 50%, observa-se que os valores dos fatores de assimetria estão dentro da faixa aceita pela literatura, assim como os fatores de retenção e as resoluções, com a utilização das fases móveis MeOH:H₂O 60:40 (v/v) e 70:30 (v/v).

Observa-se que a melhor fase móvel a ser empregada na avaliação da FE com CCP de 55% é a de composição MeOH:H₂O 70:30 (v/v), uma vez que apresenta os parâmetros cromatográficos dentro das faixas aceitas pela literatura (fator de assimetria

entre 0,9 e 1,6; fator de retenção menor que 10 e resolução acima de 1,5), além de apresentar eficiência satisfatória.

Portanto, analisando-se os resultados obtidos para as três diferentes cargas, verifica-se que a FE com CCP de 50%, analisada em FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), apresentou maior eficiência e parâmetros cromatográficos dentro dos valores aceitos pela literatura^{1,63} (fator de assimetria no intervalo de 0,9 a 1,6; fator de retenção entre 1 e 10; e resolução acima de 1,5), assim como elevada porcentagem de carbono, sendo esta carga selecionada para a preparação das fases estacionárias imobilizadas.

4.3.2 Imobilização das fases estacionárias

A Figura 38 mostra os cromatogramas obtidos na avaliação cromatográfica das fases estacionárias imobilizadas por micro-ondas a 520 W por 90 minutos, 620 W por 80 minutos e 720 W por 70 minutos, com carga copolimérica de 50%, utilizando-se as MT-1 e MT-2, cujos parâmetros cromatográficos e porcentagens de carbono obtidas por análise elementar das fases são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros cromatográficos obtidos para as fases estacionárias imobilizadas com CCP 50%, em diferentes condições de imobilização.

Potência (W) / Temperatura (°C)	Tempo efetivo de radiação* (min)	Composição FM MeOH:H ₂ O (% v/v)	N/m ^a (m ⁻¹)	As 10% ^a	As 10% ^b	k ^{a,c}	Rs ^d	% C
520 / 104	90	50:50	48000	1,2	1,3	17,5	6,7	
520 / 104	90	60:40	48000	1,3	1,5	7,0	4,4	16
520 / 104	90	70:30	48000	1,3	1,9	2,9	2,5	
620 / 124	80	50:50	61000	0,8	0,7	12,1	7,4	
620 / 124	80	60:40	64000	0,9	1,0	5,3	4,9	13
620 / 124	80	70:30	62000	0,9	1,1	2,1	2,7	
720 / 144	70	50:50	26000	2,0	1,6	14,9	5,0	
720 / 144	70	60:40	27000	1,9	2,0	6,3	3,3	13
720 / 144	70	70:30	26000	2,0	1,9	2,6	1,8	

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm. *Tempo efetivo de radiação: tempo de imobilização por micro-ondas, sem considerar a etapa de resfriamento.

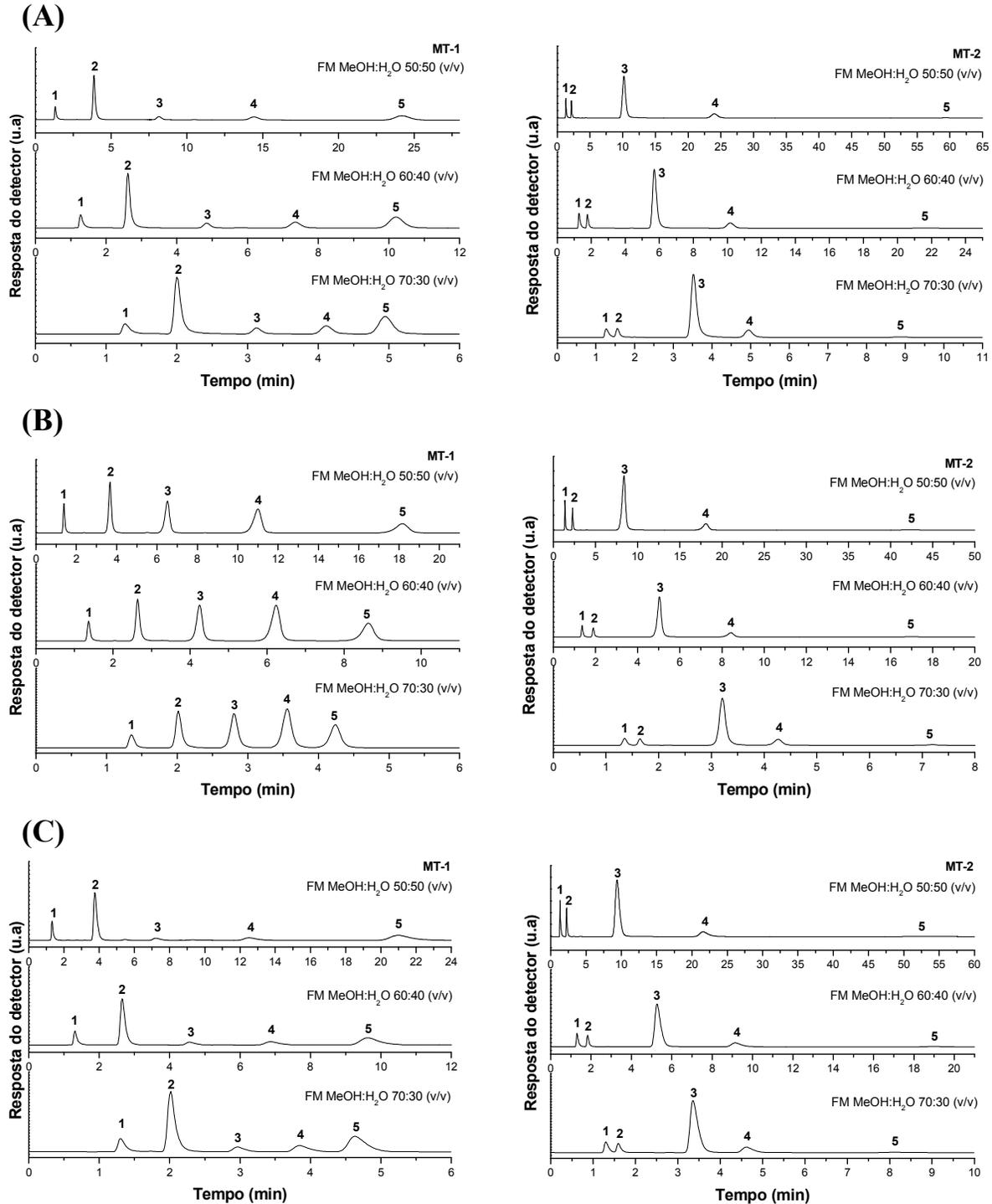


Figura 38: Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias, com CCP de 50%, em diferentes condições de imobilização por micro-ondas e composições de FM MeOH:H₂O, utilizando-se a MT-1 e a MT-2: (A) FE imobilizada a 520 W por 90 min; (B) FE imobilizada a 620 W por 80 min; e (C) FE imobilizada a 720 W por 70 min. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafeno.

Verificando-se os resultados apresentados na Tabela 2, tem-se que a FE que apresentou maior eficiência e parâmetros cromatográficos dentro da faixa aceita na literatura foi a imobilizada a 620 W por 80 min, analisada em FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v). Portanto, estas condições foram selecionadas para dar continuidade ao estudo de otimização da imobilização por micro-ondas.

4.3.3 Estudo das condições de otimização da imobilização por micro-ondas

A partir da FE imobilizada a 620 W por 80 min, novas fases estacionárias foram preparadas, variando-se os valores de potência e tempo de radiação de acordo com um planejamento experimental em estrela⁶⁴, cuja matriz do planejamento está mostrada na Tabela 3.

Para realização do planejamento, os fatores potência e tempo foram codificados como X_1 e X_2 , respectivamente, conforme a Equação 11:

$$X_n = \frac{F_i - F_{\text{ponto central}}}{F_{\text{variação}}} \quad (11)$$

sendo:

X_n : valor codificado, sendo X_1 para o fator potência e X_2 para o fator tempo.

F_i : valor do fator de interesse.

$F_{\text{ponto central}}$: valor do fator de interesse no ponto central.

$F_{\text{variação}}$: valor de variação do fator de interesse.

Para o fator potência, tem-se $F_{\text{ponto central}} = 620$ W e $F_{\text{variação}} = 50$ W e, para o fator tempo, tem-se $F_{\text{ponto central}} = 80$ min e $F_{\text{variação}} = 10$ min.

Os parâmetros cromatográficos obtidos para a análise da MT-1, neste estudo, estão mostrados na Tabela 3, assim como as porcentagens de carbono obtidas por análise elementar das fases. A Figura 39 mostra os cromatogramas obtidos para as fases preparadas.

Tabela 3: Parâmetros cromatográficos obtidos na determinação das condições ótimas de imobilização.

Experimento	Potência (W) / Temperatura (°C)	Valores Codificados		Tempo efetivo de radiação (min)*	N/m ^a (m ⁻¹)	As 10% ^a	k ^b	Rs ^c	% C
		X ₁	X ₂						
1	570 / 114	-1	-1	70	24000	1,2	7,5	3,1	14
2	670 / 134	1	-1	70	20000	1,5	7,6	3,0	14
3	570 / 114	-1	1	90	25000	0,8	9,7	3,4	15
4	670 / 134	1	1	90	21000	0,9	11,1	3,2	16
5	620 / 124	0	0	80	38000	1,5	9,3	4,2	18
6	620 / 124	0	0	80	39000	1,5	6,7	4,0	13
7	620 / 124	0	0	80	37000	1,5	10,8	4,2	18
8	549 / 110	- 1,4	0	80	52000	1,0	7,5	4,6	14
9	620 / 124	0	1,4	94	31000	0,7	9,0	3,7	14
10	691 / 138	1,4	0	80	36000	0,8	8,7	3,8	15
11	620 / 124	0	- 1,4	66	30000	1,4	7,2	3,5	14

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bt_M medido para a uracila; ^ccalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão de 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm. *Tempo efetivo de radiação: tempo de imobilização por micro-ondas, sem considerar a etapa de resfriamento.

Analisando-se os resultados da Tabela 3, tem-se que todas as fases apresentaram fator de assimetria aceitável, exceto para as fases imobilizadas a 570 W por 90 min, 620 W por 94 min e 691 W por 80 min, que apresentaram fator de assimetria abaixo de 0,9. Em termos de eficiência, nota-se que as fases estacionárias que apresentam maior eficiência, acima de 36000 pratos/m, estão localizadas na faixa de 80 minutos de imobilização.

Os valores de eficiência obtidos para as fases imobilizadas a 620 W por 80 minutos foram significativamente diferentes da eficiência obtida para esta mesma FE, preparada inicialmente (64000 pratos/m), provavelmente devido às diferenças ocorridas no preparo das fases. Em virtude da eficiência da primeira fase não ter sido repetível, utilizaram-se os valores de eficiência mais baixos (em torno de 38000 pratos/m), porém reproduzíveis para as três diferentes fases preparadas. A repetibilidade do preparo das fases estacionárias foi avaliada em termos de uma estimativa do desvio padrão relativo para as fases imobilizadas a 620 W por 80 min. A estimativa do desvio padrão relativo, obtido em termos da eficiência da separação do composto naftaleno, foi de 2,6%, indicando que o processo de preparo das fases estacionárias apresenta boa repetibilidade.

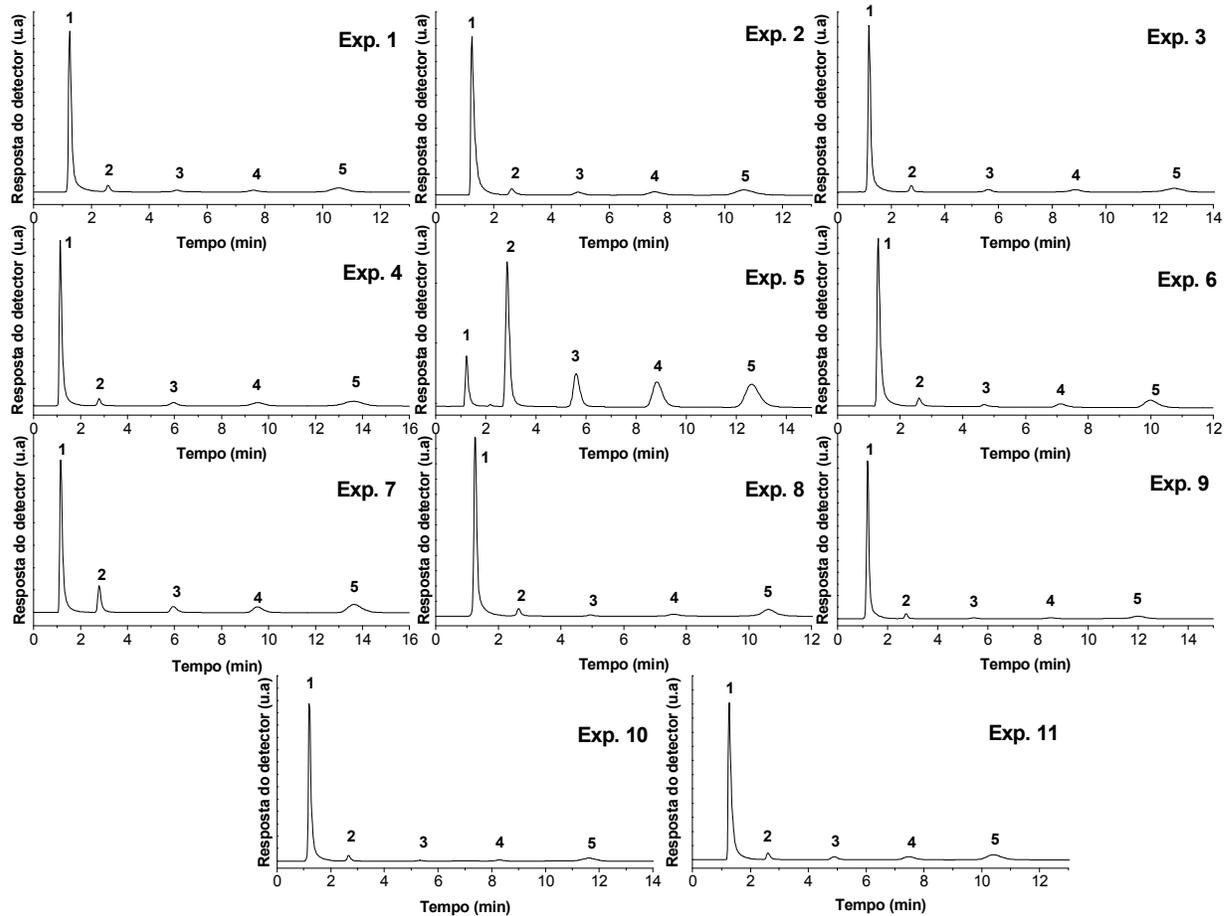


Figura 39: Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias imobilizadas a diferentes condições de temperatura e tempo, utilizando-se a MT-1. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40, vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

A partir da FE imobilizada a 549 W, que apresentou maior eficiência e parâmetros cromatográficos dentro da faixa aceita pela literatura, novas fases estacionárias foram preparadas, variando-se a potência em torno de 549 W e mantendo-se o tempo de imobilização de 80 minutos, a fim de se obter uma FE com melhor desempenho cromatográfico. As novas fases estacionárias foram avaliadas cromatograficamente utilizando-se a MT-1 e a MT-2 e os cromatogramas e parâmetros cromatográficos obtidos estão apresentados, respectivamente, na Figura 40 e na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos obtidos na otimização das condições de imobilização.

Potência (W) / Temperatura (°C)	Tempo efetivo de radiação (min)	N/m ^a (m ⁻¹)	As 10% ^a	As 10% ^b	k ^{a,c}	Rs ^d	% C
490 / 98	80	37000	1,1	1,6	4,2	3,5	10
520 / 104	80	53000	1,1	1,6	2,6	3,7	9
540 / 108	80	61000	1,0	1,5	4,9	4,5	15
549 / 110	80	52000	1,0	0,9	7,5	4,6	14
560 / 112	80	42000	1,8	2,8	4,2	3,8	9
580 / 116	80	64000	1,1	1,9	4,7	4,9	9
600 / 120	80	40000	1,8	2,1	5,0	3,9	12

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão de 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

A partir dos resultados da Tabela 4, observa-se que as fases estacionárias imobilizadas a 560 W e acima desta potência, apresentaram fatores de assimetria acima dos valores aceitos na literatura. As demais fases apresentaram fatores de assimetria dentro da faixa aceita pela literatura, assim como os fatores de retenção e resolução. A FE que apresentou parâmetros cromatográficos adequados e maior eficiência foi a imobilizada a 540 W por 80 minutos e, portanto, selecionaram-se estas condições de potência e tempo para o preparo da FE imobilizada.

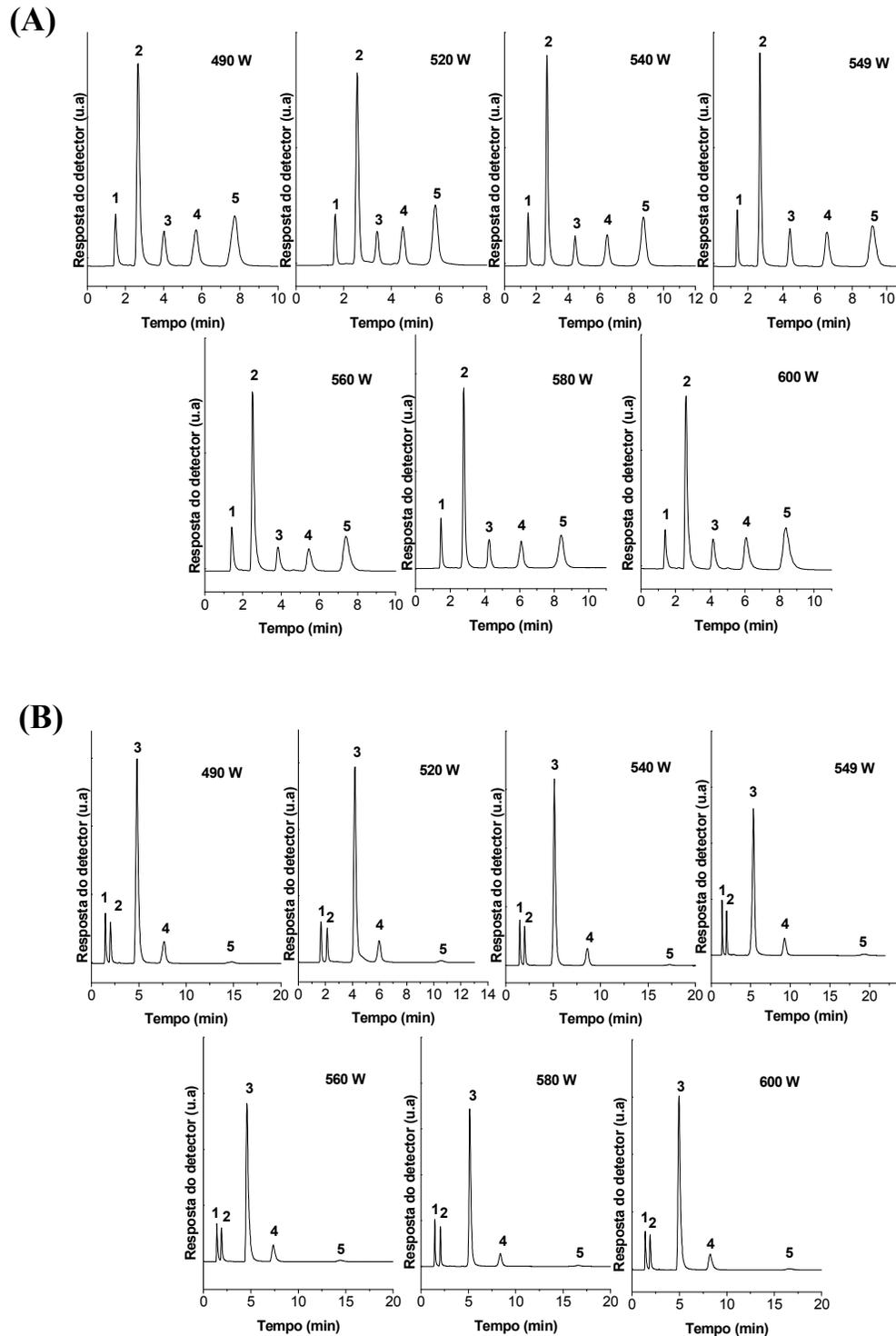


Figura 40: Cromatogramas obtidos nas análises das fases imobilizadas a diferentes condições de potência e tempo de 80 minutos, utilizando-se as misturas teste: (A) MT-1 e (B) MT-2. Condições cromatográficas: vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.4 Otimização da composição da fase móvel e da vazão de análise

A FE imobilizada a 540 W por 80 min foi avaliada em diferentes composições da FM MeOH:H₂O, utilizando-se a MT-1, com o objetivo de otimizar as condições cromatográficas de análise. Os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se diferentes composições de fase móvel MeOH:H₂O.

Composição FM MeOH:H ₂ O (v/v)	N/m (m ⁻¹) ^a	As 10% ^a	As 10% ^b	t' _R ^{a,c}	k ^{a,c}	Rs ^d
50:50	58000	0,8	1,6	17,6	11,8	7,1
55:45	54000	0,9	1,2	10,6	7,2	5,4
60:40	55000	0,9	1,2	6,9	4,7	4,3
65:35	54000	1,1	1,2	4,3	3,0	3,2
70:30	53000	1,1	1,3	3,0	2,0	2,3
75:25	51000	1,2	1,5	1,9	1,3	1,6
80:20	44000	1,5	1,4	1,1	0,7	0,9

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: vazão de 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

Analisando-se os resultados da Tabela 5, observa-se que as composições de FM MeOH:H₂O 55:45, 60:40, 65:35, 70:30 e 75:25 (v/v) apresentaram parâmetros cromatográficos dentro da faixa aceita pela literatura, assim como boa eficiência. A composição de FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v) foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, uma vez que apresentou boa eficiência na separação dos compostos da MT-1 e tempo de análise satisfatório. Assim, a partir desta composição de FM, construiu-se a curva de van Deemter para determinação da vazão ótima de análise (Figura 41). Como pode-se observar, a altura do prato mínima, que corresponde a um valor máximo de eficiência, foi obtida com a utilização de uma vazão linear média da FM de 0,03 m/s que corresponde a uma vazão de análise de 0,3 mL/min.

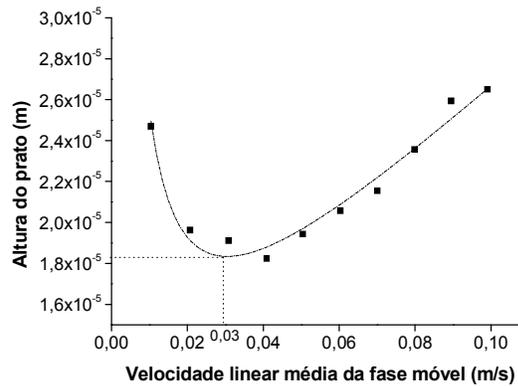


Figura 41: Representação da curva de van Deemter, para a FE imobilizada a 540 W / 80 min.

4.5 Otimização do tempo de repouso entre a imobilização e a extração

A fim de diminuir o tempo necessário para o preparo das fases estacionárias imobilizadas à base de sílica nua e do copolímero PFPMS, realizou-se um estudo sobre o tempo de repouso da FE entre a etapa de imobilização por micro-ondas e a etapa de extração do copolímero não imobilizado.

Para isso, preparou-se a FE imobilizada a 540 W por 80 min, conforme descrito no item 3.7, porém alterando-se o tempo de repouso da FE entre as etapas de imobilização e extração, sendo de 1, 4 e 8 dias.

A otimização do tempo de repouso foi realizada com base em avaliações cromatográficas da MT-1 e MT-2, assim como através da porcentagem de carbono das fases, obtida por análise elementar. A Figura 42 e a Tabela 6 mostram, respectivamente, os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos compostos para as fases extraídas após 1, 4 e 8 dias da imobilização.

Analisando-se os resultados obtidos para os diferentes tempos de repouso entre a etapa de imobilização e a de extração, observa-se que todas as fases estacionárias apresentaram parâmetros cromatográficos na faixa aceita pela literatura. Porém, foi possível observar maior valor de eficiência, em relação ao pico do naftaleno, para a FE extraída após 8 dias da realização da imobilização.

Em relação à porcentagem de carbono, tem-se que as fases apresentaram teor de carbono semelhante, após a realização da extração, indicando a presença da

mesma quantidade de copolímero nas fases. No entanto, para a FE extraída após 4 dias da imobilização, observa-se um maior decaimento da porcentagem de carbono, após a FE passar pela etapa de enchimento e análise cromatográfica. Esse comportamento pode ser decorrente da perda de copolímero durante a etapa de enchimento, uma vez que esta é realizada sob alta pressão, o que justifica também a baixa eficiência desta coluna cromatográfica. O decaimento no teor de carbono após a etapa de enchimento e análise não foi observado para as fases extraídas após 1 e 8 dias.

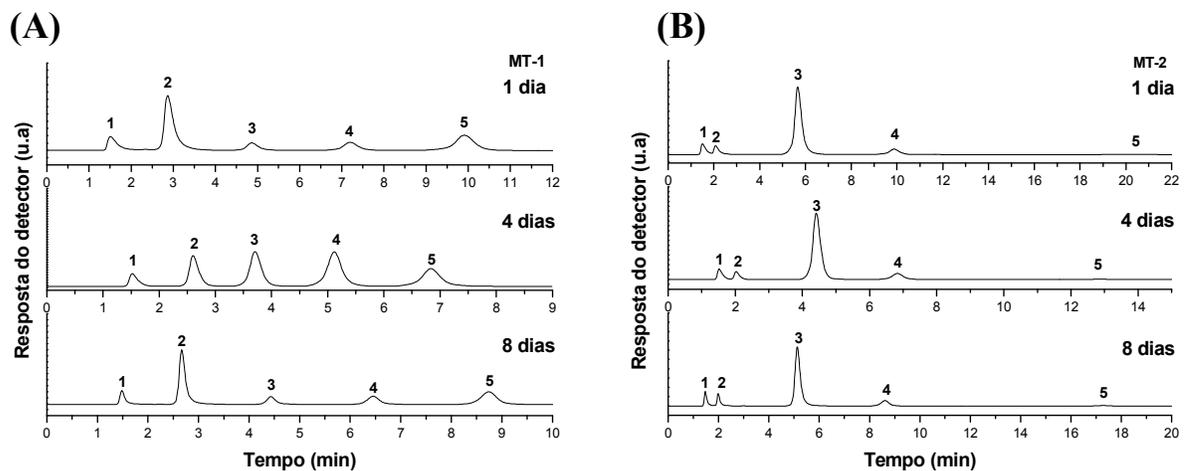


Figura 42: Cromatogramas obtidos nas análises das fases estacionárias preparadas com diferentes tempos de repouso entre a imobilização e a extração, utilizando-se: (A): MT-1 e (B): MT-2. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV-Vis a 254 nm. Identificação dos picos: (MT-1): (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno; (MT-2): (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 6: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, após diferentes dias de repouso entre a etapa de imobilização e extração, assim como as porcentagens de carbono obtidas para as fases.

Tempo de repouso (dias)	N/m (m ⁻¹) ^a	As 10% ^a	As 10% ^b	k ^{a,c}	Rs ^d	% C			
						Antes extração	Após Extração	Após Enchimento	Após Análise
1	39000	0,9	1,3	5,6	3,8		14	13	13
4	35000	1,0	1,2	3,5	3,2	26	14	10	10
8	61000	1,0	1,5	4,9	4,5		15	14	14

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão de 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

Foi selecionado 8 dias de repouso entre a etapa de imobilização e a etapa de extração para dar continuidade ao trabalho, pois resultou em uma fase estacionária com maior eficiência e estabilidade.

4.6 Repetibilidade do enchimento

A etapa de enchimento das colunas cromatográficas é influenciada por algumas variáveis que não podem ser totalmente controladas, como vazão do gás nitrogênio, transferência da suspensão da FE para o sistema, conexões da coluna e do sistema, ajuste manual da pressão, entre outros⁶⁵.

Em virtude disso, e uma vez que a etapa de enchimento das colunas possui elevada influência nos valores dos parâmetros cromatográficos e da eficiência das colunas, esta etapa foi realizada várias vezes, para uma mesma fase estacionária, a fim de verificar a repetibilidade do processo.

A fim de estimar o desvio padrão relativo da etapa de enchimento das colunas cromatográficas, selecionou-se uma das fases imobilizadas a 620 W por 80 minutos e realizou-se a avaliação cromatográfica, utilizando-se a MT-1, em cinco enchimentos realizados. Os parâmetros avaliados foram a eficiência e a assimetria do pico a 10% da altura calculada para o naftaleno. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 7: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 620 W por 80 minutos, com a MT-1, a fim de avaliar a variação decorrente do enchimento das colunas cromatográficas.

Enchimento	N/m (m ⁻¹) ^a	As 10% ^a	k ^{a,b}	Rs ^c
1	33000	0,8	7,9	3,4
2	30000	1,1	5,8	2,8
3	25000	1,0	6,4	2,6
4	41000	1,2	9,6	4,3
5	39000	1,4	6,2	3,3
Média	33600	1,1	-	-
Estimativa do desvio padrão	6542	0,2	-	-
Estimativa do desvio padrão relativo (%)	19	18	-	-

^acalculado para o pico do naftaleno; ^bt_M medido para a uracila; ^ccalculado para o par tolueno-naftaleno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 65:35 (v/v), vazão de 0,4 mL/min, temperatura ambiente e detecção UV-Vis a 254 nm.

Analisando-se os resultados da Tabela 7, estima-se que o desvio padrão relativo em relação à eficiência para a separação do naftaleno e o fator de assimetria a 10% da altura de seu pico é de aproximadamente 19%, sendo um resultado satisfatório, considerando o elevado número de fatores que influenciam o processo de enchimento das colunas cromatográficas.

4.7 Caracterização físico-química das fases estacionárias

4.7.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho da FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, obtido através do método da pastilha de KBr (1% m/m) e por refletância difusa, estão representados na Figura 43.

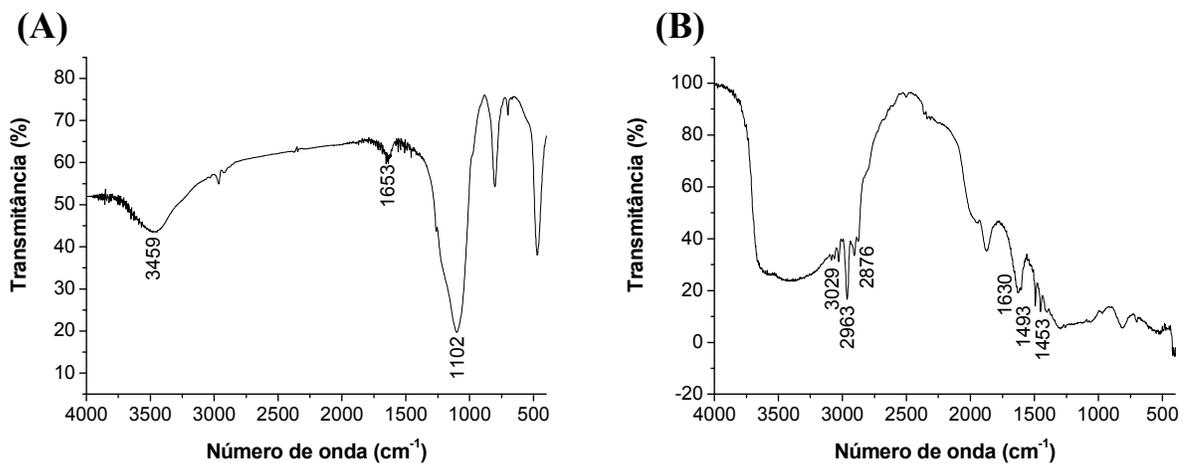


Figura 43: Espectros de absorção no infravermelho obtidos para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos através das técnicas: (A) pastilha de KBr; (B) refletância difusa.

No espectro obtido pela técnica de pastilha de KBr é possível verificar a presença de bandas em 3459 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} e 1102 cm^{-1} , que estão relacionadas, principalmente, com as características do suporte cromatográfico. As bandas observadas em 3459 e 1653 cm^{-1} referem-se às vibrações das moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica, sendo atribuídas, respectivamente, ao estiramento O-H das moléculas de água que interagem por ligações de hidrogênio e às deformações angulares simétricas no plano (tesoura) das moléculas. Além disso, a banda de absorção observada a 3459 cm^{-1} também se refere ao estiramento O-H dos diferentes

grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica. A banda de absorção em 1102 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações siloxanos Si-O-Si.

Também no espectro obtido pela técnica de pastilha de KBr (Figura 32), verifica-se o aparecimento de uma banda de baixa intensidade em torno de 3000 cm^{-1} , referente ao copolímero, assim como é possível observar o desaparecimento do ombro em 976 cm^{-1} , referente ao estiramento Si-O dos grupos silanóis isolados, comprovando que o processo de sorção e imobilização do copolímero foi efetiva, havendo diminuição dos grupos silanóis residuais na superfície do suporte cromatográfico.

Analisando-se o espectro obtido por refletância difusa, é possível verificar que houve a interação e imobilização do copolímero no suporte da sílica. A banda intensa localizada em 2963 cm^{-1} , assim como as bandas de menor intensidade presentes na faixa de 2876 cm^{-1} a 3029 cm^{-1} são características do copolímero PFPMS, uma vez que a banda localizada em 2963 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-H dos grupos metil e metileno e as bandas localizadas acima de 3000 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação =C-H do anel aromático.

As bandas localizadas na região de 1400 e 1600 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações C=C do anel aromático. As bandas presentes em 1453 e 1493 cm^{-1} também podem ser atribuídas à deformação angular C-H dos grupos metil ($-\text{CH}_3$) e metileno ($-\text{CH}_2-$).

4.7.2 Determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros

As fases estacionárias sorvidas com carga copolimérica de 40%, 50% e 55% e a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos foram submetidas à análises para determinação da área superficial e volume e diâmetro de poros. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de área superficial, volume e diâmetro de poros das fases estacionárias sorvidas a diferentes cargas copoliméricas e da FE imobilizada a 540 W por 80 min, obtidos pelas técnicas de BET e BJH.

Fase Estacionária	Área superficial (m^2/g)	Volume de poros (cm^3/g)	Diâmetro de poros (nm)
Sorvida CCP 40%	76	0,24	12,4
Sorvida CCP 50%	210	0,64	12,3
Sorvida CCP 55%	84	0,25	11,7
Imobilizada a 540 W / 80 min	208	0,56	10,8

De modo geral, analisando-se a Tabela 8, observa-se que a área superficial específica e o volume de poros das fases estacionárias sorvidas e da FE imobilizada são inferiores aos resultados obtidos para o suporte cromatográfico (área superficial de 295 m²/g e volume de poros de 0,85 cm³/g), sugerindo que o copolímero PFPMS encontra-se sorvido no interior dos poros das partículas de sílica⁶⁶.

Em relação ao diâmetro de poro, tem-se que seu valor é relativamente o mesmo para todas as fases estacionárias preparadas, sugerindo que o diâmetro de poro da sílica não foi afetado pelos processos de sorção e imobilização do copolímero.

Analisando-se os resultados obtidos para as fases sorvidas, observa-se que as fases com carga copolimérica de 40% e 55% apresentaram área superficial específica abaixo de 100 m²/g, além de pequeno volume de poros, sugerindo que houve obstrução dos poros da sílica.

4.7.3 Espectroscopia de RMN ²⁹Si e ¹³C

A Figura 44 apresenta o espectro de RMN de ²⁹Si obtido para a fase estacionária imobilizada a 540 W por 80 minutos.

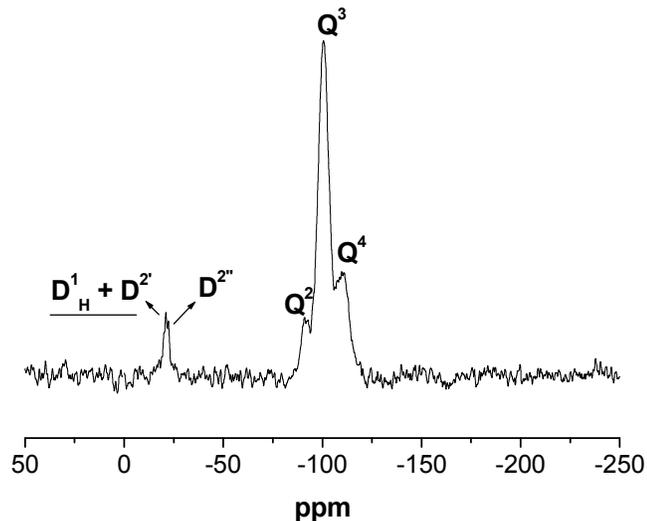


Figura 44: Espectro de RMN de ²⁹Si para a fase estacionária imobilizada a 540 W por 80 minutos.

Analisando-se o espectro de RMN de ²⁹Si para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, observa-se a presença de três picos sobrepostos na região de -20 a -22 ppm,

indicando a presença de espécies de silício D^1_H , D^2 e $D^{2''}$, que são sinais resultantes da interação entre o suporte de sílica e as cadeias do copolímero PFPMS.

A razão Q^3/Q^4 , que é uma medida comparativa entre a quantidade de grupos silanóis livres na superfície da sílica e a de grupos siloxanos, para a FE immobilizada a 540 W por 80 minutos, é igual a 3,5. Comparando-se este valor com a razão Q^3/Q^4 obtida para o suporte de sílica nua ($Q^3/Q^4 = 4,9$), tem-se que houve diminuição desta razão, em aproximadamente 29% em relação à razão Q^3/Q^4 do suporte cromatográfico, indicando diminuição dos grupos silanóis presentes na superfície da sílica.

As interações entre o copolímero e os grupos silanóis da superfície da sílica também podem ser observadas através da diminuição da intensidade do pico referente ao grupo Q^2 , comparando-se a fase estacionária com o suporte de sílica nua. A diminuição da intensidade do pico Q^2 foi de aproximadamente 36% (em relação à altura do grupo Q^2 presente na superfície da sílica), indicando que a interação do copolímero ocorreu com os grupos silanóis livres, vicinais e geminais da superfície da sílica, porém em maior intensidade com os silanóis geminais da superfície da sílica.

A Figura 45 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C obtido para a FE immobilizada a 540 W por 80 minutos.

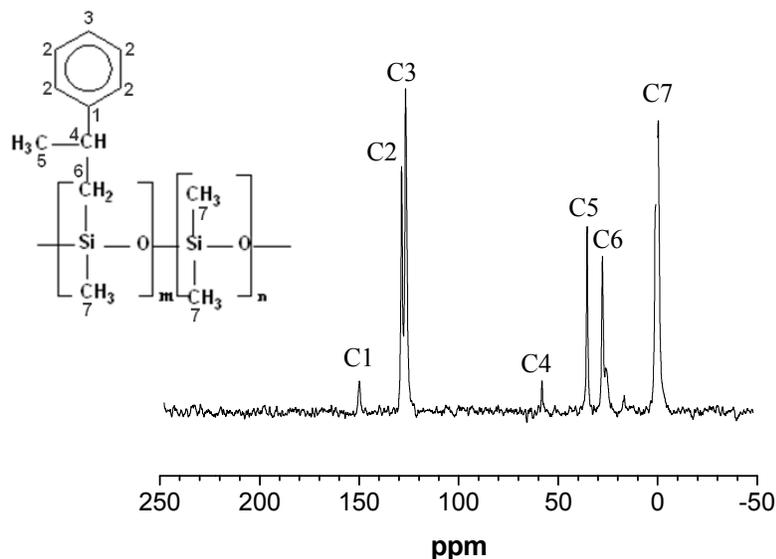


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C para a fase estacionária immobilizada a 540 W por 80 minutos.

Analisando-se o espectro de RMN ^{13}C obtido para a FE imobilizada, observa-se a presença de três picos intensos na região de 100 a 150 ppm, que são referentes ao grupo fenil do copolímero PFPMS. O pico menos intenso presente em 150 ppm refere-se ao C1 da Figura 45, uma vez que não há a presença de átomo de hidrogênio diretamente ligado ao átomo de carbono. Os carbonos do anel aromático (C2), localizados nas posições “orto” e “meta” são idênticos, apresentando pico de deslocamento químico em 130 ppm. O C3, representado na Figura 45, está localizado em 126 ppm.

Na região de deslocamento químico entre 0 e 60 ppm, estão localizados os carbonos saturados, inclusive o diretamente ligado ao grupo fenil (C4), que está localizado em 58 ppm. O carbono C5 está localizado em 35 ppm, o C6 em 28 ppm e o C7 em 0,6 ppm⁶⁷.

Assim, tem-se que o espectro de RMN de ^{13}C comprova que o copolímero PFPMS encontra-se sorvido, imobilizado e quimicamente ligado na superfície da sílica.

4.8 Avaliação cromatográfica da FE imobilizada a 540 W por 80 min

4.8.1 Mistura teste de Engelhardt e Jungheim

A Figura 46 e a Tabela 9 mostram, respectivamente, o cromatograma e os parâmetros cromatográficos obtidos na separação da MT de Engelhardt e Jungheim, utilizando-se a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos.

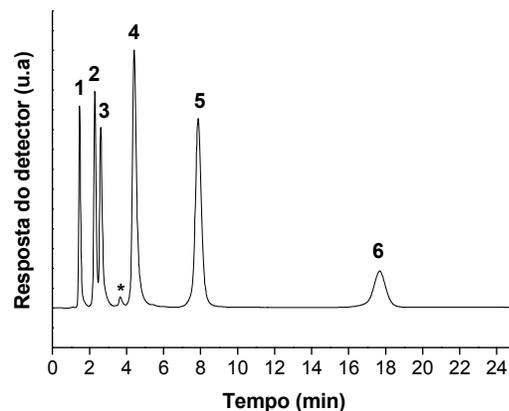


Figura 46: Cromatograma obtido na análise da mistura teste de Engelhardt e Jungheim, empregando-se a FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v); volume de injeção: 5 μL ; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) anilina, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno e (*) impureza.

Tabela 9: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se a mistura teste de Engelhardt e Jungheim.

Composto	t_R (min)	k	As 10%	Rs	N/m (m^{-1})	Razões
Uracila	1,5	NA*	1,4	NA*	NA*	
Fenol	2,3	0,6	1,6	4,1	29000	$A_{S_{anilina}}/A_{S_{fenol}} = 1,1$
Anilina	2,6	0,8	1,8	1,3	27000	
N,N-dimetilanilina	4,4	2,0	1,7	5,5	34000	$k_{etilbenzeno}/k_{tolueno} = 2,5$
Tolueno	7,9	4,4	1,1	7,0	46000	
Etilbenzeno	17,7	11,1	0,9	10,9	58000	

* NA: não aplicável

A partir dos resultados obtidos, tem-se que a eluição da anilina ocorre após o fenol, indicando a presença de grupos silanóis residuais na FE. Também em termos da atividade silanofílica, tem-se que a razão entre o fator de assimetria da anilina e do fenol é inferior a 1,3 e a N,N-dimetilanilina elui antes do tolueno, indicando que embora haja grupos silanóis residuais, estes estão em baixa quantidade.

Os fatores de assimetria para os compostos básicos (anilina e N,N-dimetilanilina) foram maiores que 1,6, indicando que o recobrimento da superfície da sílica com o copolímero PFPMS não foi homogêneo, restando grupos silanóis residuais que interagiram com os compostos básicos, resultando em picos com caudas acentuadas⁵¹.

Em relação à seletividade hidrofóbica, tem-se a separação completa dos compostos etilbenzeno e tolueno, com fator de separação ($k_{etilbenzeno}/k_{tolueno}$) igual a 2,5. Estes compostos se diferem pela presença de um grupo metil, indicando que a FE preparada possui bom desempenho para a separação de compostos hidrofóbicos.

4.8.2 Misturas teste de Szabó e Csató

A Figura 47 e a Tabela 10 mostram, respectivamente, os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos obtidos nas análises das misturas teste A e B de Szabó e Csató, utilizando a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos.

A partir dos resultados obtidos na análise das misturas teste de Szabó e Csató, tem-se a separação completa dos compostos com boa resolução, eficiência satisfatória e baixo tempo de análise. Porém, observa-se que o fator de assimetria encontra-se abaixo do valor aceito na literatura para os compostos propilbenzeno, p-xileno e tolueno, da MT A, e para os compostos tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno e butilbenzeno, da MT B.

De acordo com os autores Szabó e Csató, a ordem de eluição dos compostos nas diferentes fases estacionárias reversas do tipo fenil citadas em seu artigo⁵² foi a mesma que a obtida experimentalmente neste trabalho, além dos compostos mais hidrofóbicos (tolueno, p-xileno e propilbenzeno) eluírem com os maiores tempos de retenção, conforme observado na análise da MT-A.

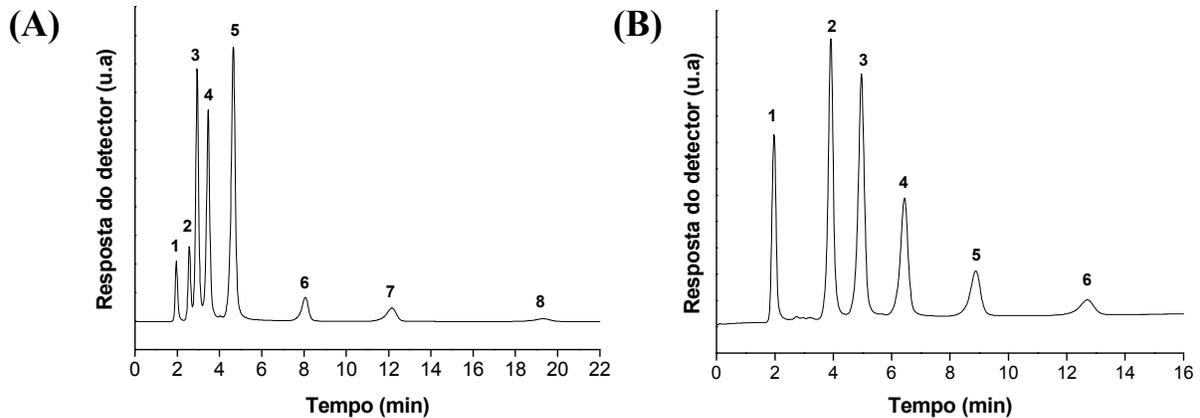


Figura 47: Cromatogramas obtidos nas análises das misturas teste A e B de Szabó e Csató com a FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos. (A) MT A, com FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v); (B) MT B, com FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (A): (1) uracila, (2) fenol, (3) m-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) p-xileno e (8) propilbenzeno; (B): (1) uracila, (2) benzeno, (3) tolueno, (4) etilbenzeno, (5) propilbenzeno, (6) butilbenzeno.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se as misturas teste A e B de Szabó e Csató.

MT	Composto	t _R (min)	k	As 10%	Rs	N/m (m ⁻¹)
A	Uracila	2,0	NA*	1,4	NA*	NA*
	Fenol	2,6	0,3	1,2	2,8	35000
	m-cresol	2,9	0,5	1,2	1,6	41000
	Acetofenona	3,5	0,8	0,9	2,0	43000
	Benzoato de metila	4,6	1,4	0,9	3,9	49000
	Tolueno	8,1	3,1	0,6	7,3	50000
	p-xileno	12,2	5,2	0,6	5,6	51000
	Propilbenzeno	19,3	8,9	0,6	6,3	53000
B	Uracila	2,0	NA*	1,1	NA*	NA*
	Benzeno	3,9	1,0	1,0	6,8	43000
	Tolueno	5,0	1,5	0,8	3,1	47000
	Etilbenzeno	6,4	2,3	0,8	3,5	49000
	Propilbenzeno	8,9	3,5	0,8	4,4	51000
	Butilbenzeno	12,7	5,4	0,8	5,0	54000

* NA: não aplicável

Através da MT B foi possível concluir que a FE possui seletividade hidrofóbica, uma vez que houve a separação, com alta eficiência e resolução adequada, de analitos que apenas se diferem pelo tamanho da cadeia alquila ligada a um grupo fenil. Portanto, a FE preparada apresenta potencial para ser empregada na separação de compostos neutros e aromáticos.

4.8.3 Mistura teste de Neue

A Figura 48 e a Tabela 11 apresentam, respectivamente, o cromatograma e os parâmetros cromatográficos obtidos na análise da MT de Neue, para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos.

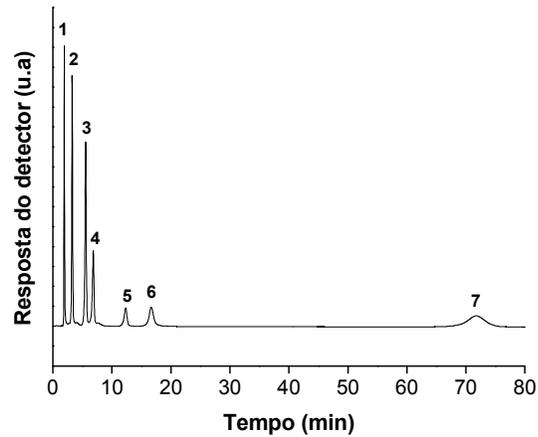


Figura 48: Cromatograma obtido na análise da mistura teste de Neue com a FE imobilizada a 540 W por 80 min. Condições cromatográficas: FM MeOH:20 mmol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,0, 65:35 (v/v), volume de injeção: 5 μ L; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) butilparabeno, (3) dipropilftalato, (4) naftaleno, (5) acenafteno, (6) propranolol e (7) amitriptilina.

Tabela 11: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se a mistura teste de Neue.

Composto	t_R (min)	k	As 10%	R_s	N/m (m^{-1})	Razões
Uracila	1,9	NA*	1,4	NA*	NA*	
Butilparabeno	3,3	0,7	1,0	6,3	46000	
Dipropilftalato	5,6	1,9	0,8	7,1	52000	$k_{acenafteno}/k_{butilparabeno} = 7,7$
Naftaleno	6,9	2,6	0,6	2,9	52000	
Acenafteno	12,3	5,4	0,7	8,1	54000	$k_{acenafteno}/k_{dipropilftalato} = 2,8$
Propranolol	16,7	7,6	1,1	3,9	40000	
Amitriptilina	71,8	36,2	0,8	15,8	44000	

* NA: não aplicável

Através dos resultados obtidos pelas razões $k_{\text{acenafteno}}/k_{\text{butilparabeno}}$ e $k_{\text{acenafteno}}/k_{\text{dipropilftalato}}$, tem-se que os compostos butilparabeno e dipropilftalato (polares) eluem antes do acenafteno (altamente hidrofóbico) e com fatores de assimetria no intervalo aceito pela literatura, indicando que as interações polares dos analitos com a FE são praticamente desprezíveis.

Em termos de atividade silanofílica, esta foi avaliada em termos do fator de retenção e do fator de assimetria dos compostos propranolol ($pK_a = 9,5$) e a amitriptilina ($pK_a = 9,4$), altamente básicos, que se encontram protonados em pH 7. Com os dados obtidos, pode-se observar que os compostos básicos eluíram com os maiores fatores de retenção, devido às fortes interações eletrostáticas com os grupos silanóis desprotonados na superfície da FE.

4.8.4 Misturas teste de Tanaka

A Figura 49 e a Tabela 12 apresentam, respectivamente, o cromatograma e os parâmetros cromatográficos obtidos nas análises das quatro misturas teste de Tanaka, na FE preparada.

A partir dos resultados obtidos com a MT A de Tanaka para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, tem-se que a seletividade hidrofóbica, avaliada em termos da razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, compostos que se diferem apenas por um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), apresentou valor dentro da faixa conseguida para as fases C18 analisadas por Tanaka e colaboradores (αCH_2 entre 1,3 e 1,5), indicando que a FE preparada possui seletividade para a separação destes compostos. Para a hidrofobicidade, avaliada por meio do fator de retenção do pentilbenzeno, obteve-se também um valor dentro da faixa das fases estacionárias estudadas por Tanaka (k_{PB} entre 1,3 e 7,6), indicando recobrimento polimérico adequado da superfície da sílica.

Em relação à separação dos compostos o-terfenila e trifenileno, tem-se que a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos possui seletividade estérica, fator influenciado pela funcionalidade do polímero, uma vez que permitiu a separação dos compostos o-terfenila e trifenileno, que possuem hidrofobicidade similar, mas diferentes planaridades (o-terfenila é um composto não planar, enquanto o trifenileno é altamente planar, possuindo maior rigidez). No entanto, em comparação com resultados obtidos por

Tanaka para as fases C18 ($\alpha_{T/O}$ entre 1,1 e 1,6), obteve-se valor de $\alpha_{T/O}$ inferior a 1, uma vez que o trifenileno eluiu antes do o-terfenila, provavelmente devido à maior interação π - π entre a FE e o composto menos rígido. Porém, houve a coeluição dos compostos o-terfenila e pentilbenzeno, indicando que a FE não possui seletividade para a separação destes compostos.

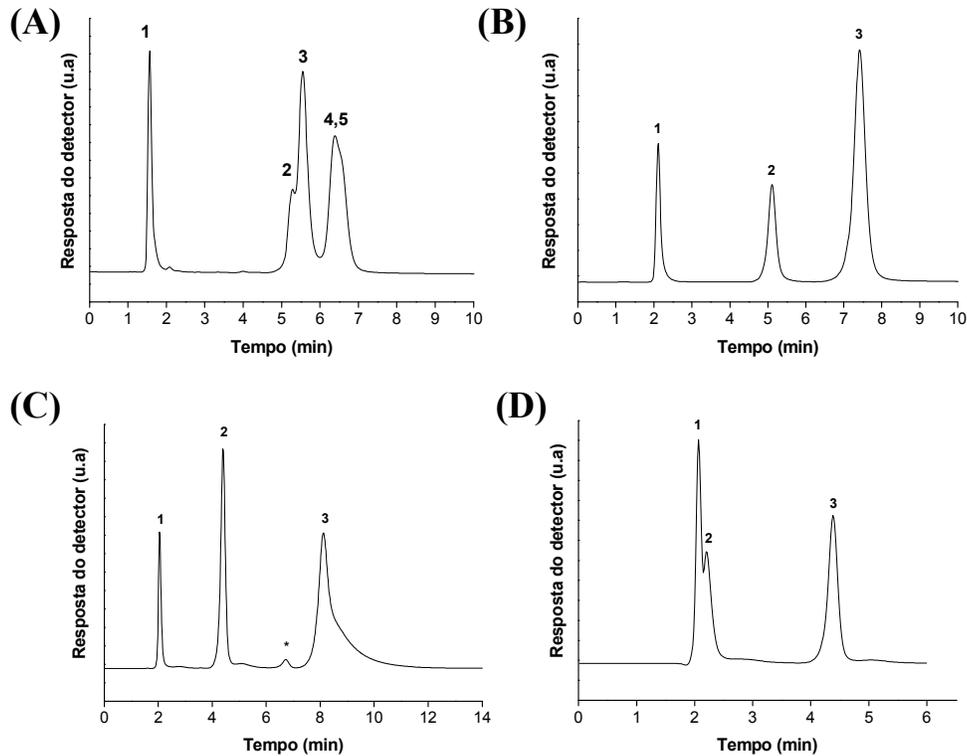


Figura 49: Cromatogramas obtidos nas análises das misturas teste de Tanaka com a FE imobilizada a 540 W por 80 min: (A) MT A, com FM MeOH:H₂O 80:20 (v/v); (B) MT B, com FM MeOH:H₂O 30:70 (v/v); (C) MT C, com FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7,6, 30:70 (v/v) e (D) MT D, com FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 2,7, 30:70 (v/v). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; vazão 0,3 mL/min; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (A): (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) trifenileno, (4) o-terfenila e (5) pentilbenzeno; (B): (1) uracila, (2) fenol, (3) cafeína; (C): (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas; (D): (1) uracila, (2) benzilamina e (3) fenol.

Através da análise da MT B de Tanaka, tem-se que a cafeína eluiu após o fenol ($k_{\text{cafeína}}/k_{\text{fenol}} = 1,8$), indicando a presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica, que não foram recobertos pelo copolímero PFPMS, responsáveis por formar ligações de hidrogênio com a cafeína, aumentando o tempo de retenção desta substância na FE.

Tabela 12: Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da FE imobilizada por micro-ondas a 540 W por 80 minutos, utilizando-se as misturas teste A, B, C e D de Tanaka.

MT	Composto	t_R (min)	k	As 10%	Rs	N/m (m ⁻¹)	Razões
A	Uracila	1,6	NA*	1,8	NA*	NA*	$k_{\text{pentilbenzeno}} = 3,1$ $k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}} = 1,3$ $k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenila}} = 0,8$ $k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{o-terfenila}} = 1$
	Butilbenzeno	5,3	2,4	0,3	15,2	75000	
	Trifenileno	5,6	2,6	1,3	0,7	44000	
	o-terfenila / pentilbenzeno	6,4	3,1	1,2	1,4	18000	
B	Uracila	2,1	NA*	1,6	NA*	NA*	$k_{\text{cafeína}}/k_{\text{fenol}} = 1,8$
	Fenol	5,1	1,4	0,9	10,3	48000	
	Cafeína	7,4	2,5	0,9	4,9	47000	
C	Uracila	2,0	NA*	1,5	NA*	NA*	$k_{\text{benzilamina}}/k_{\text{fenol}} = 2,6$
	Fenol	4,4	1,1	0,9	9,4	53000	
	Benzilamina	8,1	3,0	3,1	6,9	30000	
D	Uracila	2,1	NA*	0,9	NA*	NA*	$k_{\text{benzilamina}}/k_{\text{fenol}} = 0,1$
	Benzilamina	2,2	0,1	4,5	0,6	20000	
	Fenol	4,4	1,1	0,9	7,7	53000	

* NA: não aplicável

Com a análise da MT C de Tanaka, em FM a pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis residuais da superfície da sílica encontram-se desprotonados (Si-O⁻), interagindo mais fortemente com a benzilamina ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6 = 2,6), através de interações eletrostáticas, resultando em cauda intensa para esse composto (As 10% = 3,1), uma vez que em pH 7,6, a benzilamina encontra-se, em sua maior parte, na forma protonada. Assim, a FE possui uma considerável capacidade de troca iônica em pH maior que 7 e uma quantidade razoável de silanóis residuais em sua superfície, sendo o valor de $\alpha_{B/F}$ a pH 7,6 considerado baixo, em comparação com diferentes fases preparadas sobre suporte de sílica^{10,16,65}.

Analisando-se os resultados obtidos com a MT D de Tanaka, tem-se que a benzilamina eluiu próxima à uracila ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7 = 0,1), uma vez que os grupos silanóis se encontram protonados em meio ácido (pH 2,7), assim como a benzilamina. Esse comportamento indica que a FE possui baixa capacidade de troca iônica em pH inferior a 3 e que os grupos silanóis residuais apresentam baixa acidez (pH 2,7 é suficiente para protoná-los).

4.9 Comparação da FE Si-PFPMS com outras fases preparadas no LabCrom

A fim de avaliar o desempenho cromatográfico da FE preparada neste estudo, a partir da sílica nua e do copolímero PFPMS, frente a outras fases estacionárias, realizou-se a comparação da FE Si(PFPMS) com outras fases preparadas no LabCrom, a partir de diferentes polímeros, suportes de sílica e tipos de imobilização. A Tabela 13 apresenta uma comparação entre diferentes fases, realizada através de algumas misturas teste.

Analisando-se a Tabela 13, comparando-se a FE preparada com a FE Si(PFPMS) sintetizada com o mesmo suporte cromatográfico e FE líquida, porém imobilizada termicamente, tem-se que ambas as fases apresentaram as mesmas características, sendo ambos os tipos de imobilização adequados para a preparação da FE Si(PFPMS).

Também na Tabela 13, comparando-se a FE preparada com a FE Si(PMFS), também à base de sílica nua, fenil e imobilizada por micro-ondas, observa-se que, de modo geral, ambas as fases apresentaram comportamento semelhante e tempos de análise próximos para a separação das MT de Tanaka, Engelhardt e Szabó, indicando que as fases possuem mecanismos de retenção semelhantes. No entanto, as fases apresentaram algumas diferenças na separação dos analitos, como por exemplo:

- A FE Si(PMFS) realizou a separação completa dos constituintes da MT-A de Tanaka, diferentemente da FE Si(PFPMS), que apresentou coeluição dos compostos pentilbenzeno e o-terfenila.

- A ordem de eluição dos compostos da MT-B de Tanaka foi diferente para ambas as fases, uma vez que o tempo de retenção da cafeína foi maior para a FE preparada, que apresentou maior capacidade de interação por ligação de hidrogênio que a FE Si(PMFS).

- Em relação à mistura teste de Engelhardt, que avalia a atividade silanofílica da FE, houve apenas alteração na ordem de eluição dos compostos anilina e fenol, uma vez que a FE Si(PFPMS) reteve mais fortemente a anilina do que a FE Si(PMFS), provavelmente devido à presença do grupo isopropil que resulta em maior aromaticidade da FE Si(PFPMS), resultando em maior interação π - π entre a FE e a anilina.

Tabela 13: Comparação da FE preparada com o copolímero PFPMS, com outras fases estacionárias preparadas no LabCrom, utilizando-se diferentes polímeros, suporte cromatográfico e tipos de imobilização.

FE Item	Si(PFPMS)	Si(PFPMS) ²⁹ TT	Si(PMFS) ²⁰	Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) ¹⁶		Si(PDMFS) e Si-Zr(PDMFS) ¹⁰	
Polímero	PFPMS ^a	PFPMS ^a	PMFS ^b	PMTDS ^c	PMTDS ^c	PDMFS ^d	PDMFS ^d
Suporte de Sílica (Kromasil, 5 µm, tipo B, esférica)	SiO ₂	SiO ₂	SiO ₂	Si-Zr	Si-Ti	SiO ₂	Si-Zr
Tipo de Imobilização	MO	TT*	MO	TT	TT	TT	TT
Hidrofobicidade	Mod.**	Mod.	Mod.	Mod.	Mod.	Mod.	Mod.
Seletividade hidrofóbica	Mod.	Mod.	Mod.	Baixa	Baixa	Mod.	Mod.
Seletividade estérica	Baixa	Baixa	Mod.	Mod.	Mod.	Baixa	Baixa
Capacidade de interação por ligação de hidrogênio	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Capacidade de troca iônica total a pH 7,6	Mod.	Mod.	Baixa	EA	Mod.	Mod.	EA
Capacidade de troca iônica em meio ácido	Baixa	Baixa	Baixa	EA	Mod.	Baixa	EA
Atividade silanofílica da FE	Baixa	-	Baixa	Baixa	Alta	-	
MT A Szabó e Csató	Mesma ordem de eluição dos compostos			-		Mesma ordem de eluição dos compostos	

- Hidrofobicidade: Baixa ($k_{PB}^e < 1,3$); Moderada (k_{PB} entre 1,3 e 7,6); Alta ($k_{PB} > 7,6$).

- Seletividade hidrofóbica: Baixa ($k_{PB}/k_{BB}^f \leq 1,3$); Moderada (k_{PB}/k_{BB} entre 1,4 e 1,5); Alta ($k_{PB}/k_{BB} > 1,5$).

- Seletividade estérica: Baixa ($\alpha_{T/O}^g \leq 1,1$); Moderada ($\alpha_{T/O}$ entre 1,2 e 1,6); Alta ($\alpha_{T/O} > 1,6$).

- Capacidade de interação por ligação de hidrogênio: Baixa ($\alpha_{C/F}^h \leq 0,9$); Alta ($\alpha_{C/F} > 1$)

- Capacidade de troca iônica total a pH 7,6: Baixa ($\alpha_{B/F}^i$ pH 7,6 ≤ 2); Moderada ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6 entre 3 e 10); Alta ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6 ≥ 11); Extremamente alta (EA, retenção irreversível da benzilamina na FE).

- Capacidade de troca iônica em meio ácido: Baixa ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7 $\leq 0,9$); Moderada ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7 entre 1 e 10); Alta ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7 ≥ 11); Extremamente alta (EA, retenção irreversível da benzilamina na FE).

- Atividade silanofílica da FE: Baixa ($As_{anilina}/As_{fenol} \leq 1,3$); Alta ($As_{anilina}/As_{fenol} > 1,3$).

*Tratamento Térmico; **Mod.: Moderada. ^aPFPMS: Poli(2-fenilpropil)metilsiloxano; ^bPMFS:

Poli(metilfenilsiloxano); ^cPMTDS: Poli(metiltetradecilsiloxano); ^dPDMFS: Poli[di(metil)siloxano(48-52%)-co-metilfenilsiloxano(52-48%)]; ^e k_{PB} : $k_{pentilbenzeno}$; ^f k_{PB}/k_{BB} : $k_{pentilbenzeno}/k_{butilbenzeno}$; ^g $\alpha_{T/O}$: $k_{trifenileno}/k_{o-terfenila}$; ^h $\alpha_{C/F}$:

$k_{cafeina}/k_{fenol}$; ⁱ $\alpha_{B/F}$: $k_{benzilamina}/k_{fenol}$.

Comparando-se a FE Si(PFPMS) com a FE Si(PDMFS), preparada a partir de um copolímero do tipo fenil e sílica nua, mas imobilizada termicamente, foi possível observar que:

- Para a separação dos compostos da MT A de Tanaka, a FE Si(PDMFS) não foi seletiva para os compostos pentilbenzeno e trifenileno, os quais puderam ser separados na FE Si(PFPMS), mostrando maior aromaticidade desta FE. Por outro lado, na FE preparada observou-se a coeluição dos compostos pentilbenzeno e o-terfenila, que foram separados na FE Si(PDMFS).

- Em relação à MT A de Szabó, observou-se a mesma ordem de eluição dos compostos para ambas as fases Si(PFPMS) e Si(PDMFS), sugerindo que as fases possuem mecanismos de retenção semelhantes para os compostos desta MT.

O copolímero PDMFS também foi imobilizado termicamente sobre suporte de sílica zirconizada, que forneceu separação satisfatória dos compostos da MT A de Tanaka, sem haver coeluição dos compostos. No entanto, esta FE apresentou maior retenção para a benzilamina, em pH 7,6 e 2,7, quando comparada com a retenção deste composto para as fases Si(PDMFS) e Si(PFPMS), indicando que a presença do zircônio aumenta a acidez dos grupos silanóis residuais do suporte de sílica.

A FE Si(PFPMS) também foi comparada com uma FE preparada a partir do polímero PMTDS, que apresenta cadeia hidrofóbica de 14 carbonos, ligado ao suporte de sílica zirconizada e sílica titanizada. As FE Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) separaram os compostos da MT A de Tanaka de modo satisfatório, sem coeluição, além de ter apresentado menor seletividade hidrofóbica, maior seletividade estérica e menor capacidade de interação por ligação de hidrogênio que a FE Si(PFPMS). Porém, observou-se elevada retenção do composto benzilamina, em relação às demais fases presentes na Tabela 13, uma vez que esta interagiu irreversivelmente com o suporte de sílica zirconizada, no qual há o aumento da acidez dos grupos silanóis, atribuído à presença dos átomos de zircônio.

Portanto, de modo geral, pode-se concluir que a FE Si(PFPMS) possui seletividade semelhante à outras fases estacionárias do tipo fenil preparadas no LabCrom, sob suporte de sílica nua, mesmo em diferentes condições de imobilização. A escolha da utilização de uma FE à outra é, dependente, portanto, das aplicações e tipos

de compostos a serem avaliados cromatograficamente. Por exemplo, para a separação de compostos básicos, aconselha-se a o emprego de suporte de sílica não metalizado, uma vez que a incorporação de metais como a zircônia ou o titânio aumentam a acidez dos grupos silanóis residuais presentes nas fases estacionárias.

4.10 Avaliação da aplicabilidade da FE imobilizada a 540 W por 80 min e comparação com colunas comerciais

4.10.1 Separação de agrotóxicos

A Figura 50 mostra os cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de cinco agrotóxicos, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 minutos e as colunas cromatográficas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®], analisadas nas mesmas condições cromatográficas.

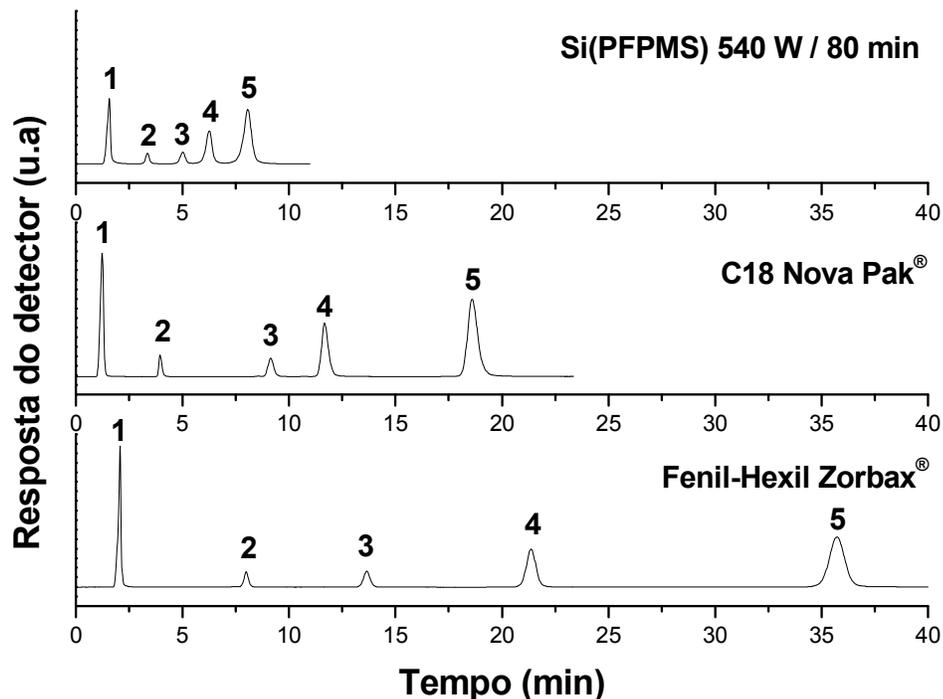


Figura 50: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de agrotóxicos, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®]. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 50:50 (v/v), volume de injeção: 5 µL; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) imazaquim, (2) cianazina, (3) atrazina, (4) diurom e (5) linurom.

A partir dos resultados obtidos para a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 minutos, tem-se que houve boa resolução na separação dos agrotóxicos (resolução mínima de 2,6), com eficiência de 37000 pratos/m e reduzido tempo de análise (9 minutos). Os fatores de assimetria apresentaram-se dentro da faixa aceitável para os compostos cianazina e atrazina; no entanto, apresentaram-se inferiores a 0,9 para os demais agrotóxicos.

Para as colunas comerciais C18 Nova Pak[®] e Fenil-Hexil Zorbax[®], tem-se que houve separação completa dos analitos, com boa eficiência e fatores de assimetria na faixa aceita pela literatura, exceto para o agrotóxico imazaquim, o qual apresentou fator de assimetria abaixo de 0,9 em ambas as análises. No entanto, os tempos de análise foram superiores, de duas a quatro vezes maiores que o tempo necessário para a realização da separação dos mesmos compostos pela FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, mesmo havendo aumento da vazão de análise para compensar o maior comprimento das colunas cromatográficas comerciais.

A análise realizada na coluna Si(PFPMS) foi de menor custo, uma vez que por ser de menor comprimento que as colunas comerciais, utilizou menor quantidade de FE, além de resultar em menor consumo de FM, por empregar vazões de análise mais reduzidas e pelo menor tempo de análise.

Em relação à ordem de eluição dos compostos, tem-se que a mesma ordem foi mantida nas três colunas cromatográficas.

Portanto, tem-se que a separação de agrotóxicos é uma aplicação potencial da fase estacionária desenvolvida, uma vez que a separação é realizada com eficiência, seletividade e baixo tempo de análise.

4.10.2 Separação de fármacos

A Figura 51 apresenta os cromatogramas obtidos na separação dos fármacos ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína, padrões analíticos (Figura 51 A), assim como a separação da mistura contendo um fármaco comercial (Figura 51 B), para a coluna cromatográfica preparada no laboratório e para as colunas comerciais.

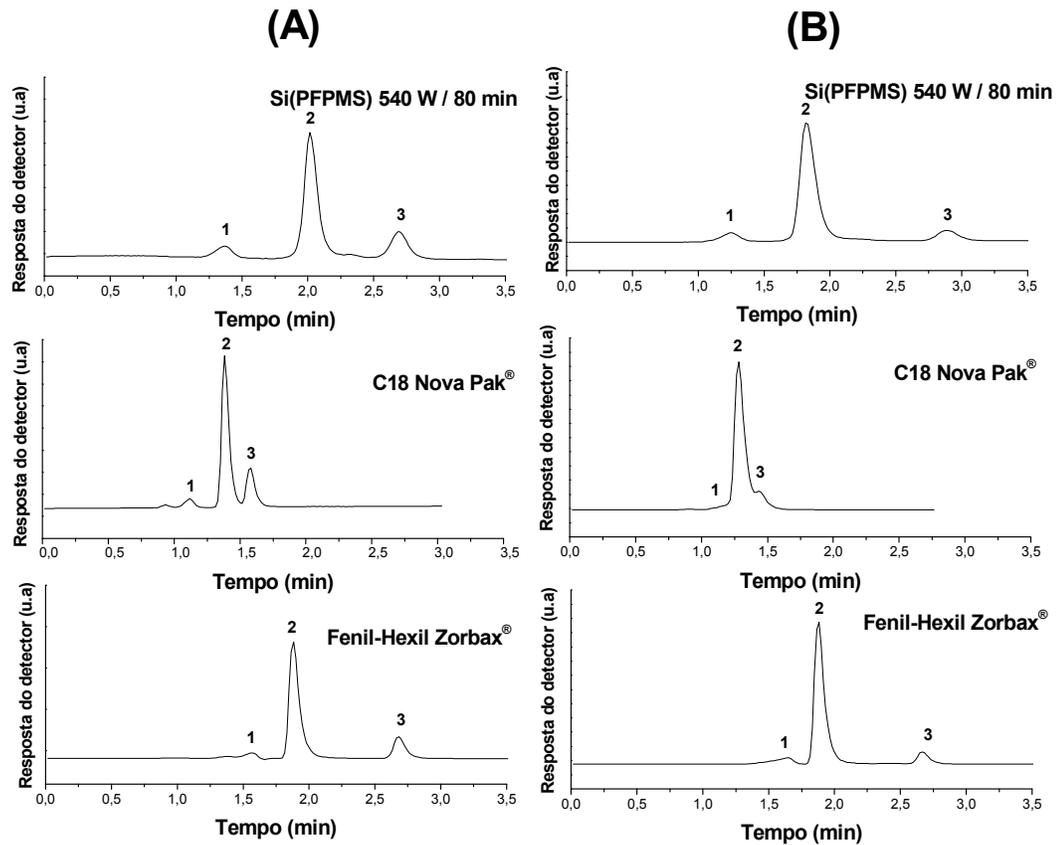


Figura 51: Cromatogramas obtidos com a FE 540 W por 80 min, com a coluna C18 Nova Pak[®] e a coluna Fenil-Hexil Zorbax[®] nas análises de misturas de fármacos: (A) padrões AAS, paracetamol, cafeína; e (B) medicamento comercial. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), volume de injeção: 5 µL; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) ácido acetilsalicílico, (2) paracetamol e (3) cafeína.

A partir dos resultados obtidos, para a separação dos fármacos padrões AAS, paracetamol e cafeína, tem-se que se obteve separações semelhantes, empregando-se a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e as colunas comerciais, havendo uma separação com resolução e eficiências satisfatórias (32000 pratos/m para a coluna preparada no laboratório), assim como baixo tempo de análise (3 minutos).

Em relação à separação do fármaco comercial, tem-se que houve separação com eficiências e resoluções satisfatórias ao se empregarem a coluna preparada no laboratório e a coluna comercial Fenil-Hexil Zorbax[®]. No entanto, a coluna comercial

C18 Nova Pak[®] não apresentou seletividade para a separação dos princípios ativos do fármaco, uma vez que houve baixa resolução entre a cafeína e o paracetamol.

De modo geral, a separação das substâncias padrão e do fármaco ocorreu em baixo tempo de análise (3 minutos), obtendo-se a mesma ordem de eluição dos compostos para todas as colunas cromatográficas analisadas, além do fato do perfil dos picos obtidos nas separações serem semelhantes, sugerindo que não houve interferência dos excipientes do fármaco nas condições da análise utilizadas.

A Figura 52 apresenta os cromatogramas obtidos na separação dos fármacos levofloxacina, dextrometorfano, diazepam, amitriptilina e nortriptilina (MT F2), para a coluna cromatográfica preparada no laboratório e para as colunas comerciais.

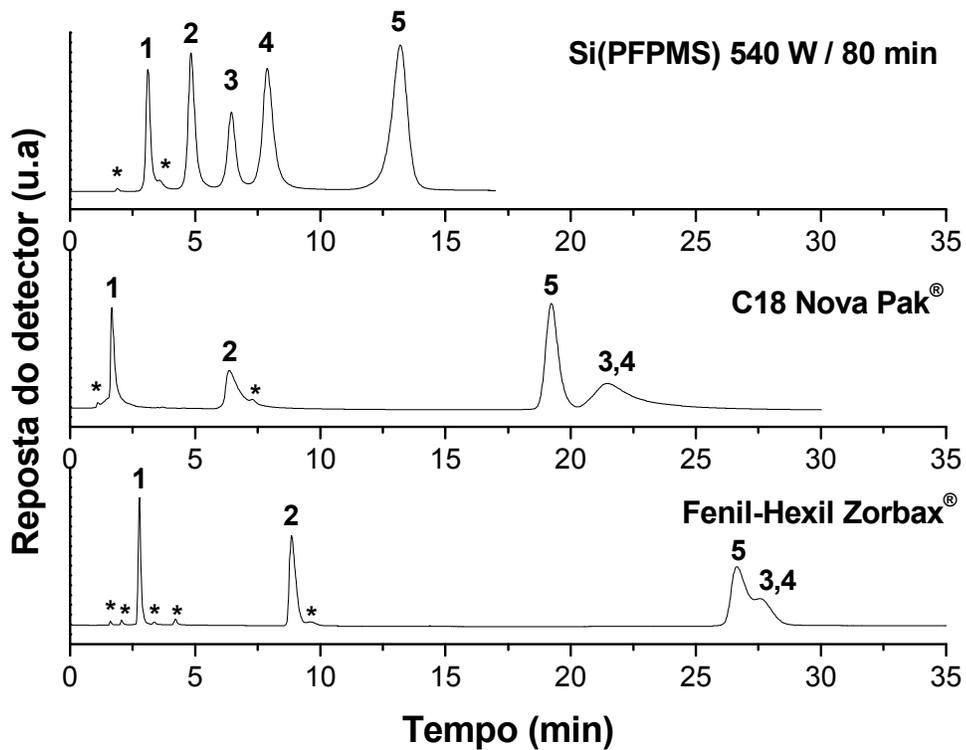


Figura 52: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de fármacos MT F2, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax[®] e C18 Nova Pak[®]. Condições cromatográficas: FM MeOH:20 mmol/L KH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 2,7 (50:50 v/v), volume de injeção: 5 µL; vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfano, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina, (5) diazepam e (*) impurezas.

Analisando-se os cromatogramas, pode-se observar que a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos apresentou melhor desempenho cromatográfico que as colunas comerciais na separação dos fármacos estudados, uma vez que houve a separação dos analitos com boa eficiência, resolução e tempo de análise (15 minutos) satisfatório, mesmo utilizando-se uma coluna de menor comprimento que as comerciais.

As colunas comerciais utilizadas não apresentaram seletividade para a separação dos compostos básicos amitriptilina e nortriptilina nas condições de análise empregadas, além de apresentarem maior retenção para esses compostos.

Além disso, tem-se que houve inversão na ordem de eluição dos analitos, uma vez que o diazepam eluiu com menor tempo de retenção que a amitriptilina e nortriptilina, nas colunas comerciais, diferentemente da coluna preparada no laboratório. Isso sugere que a fase preparada possui caráter mais polar que as FE comerciais, uma vez que as colunas comerciais são capeadas (C18 Nova Pak[®] é capeada e a Fenil-Hexil Zorbax[®] é bicapeada), além da coluna C18 Nova Pak[®] ser altamente apolar e a Fenil-Hexil Zorbax[®] conter o grupo espaçador hexil, diferentemente da FE preparada, que não é capeada e possui um grupo espaçador de maior polaridade (isopropil).

As análises foram realizadas em meio ácido com o objetivo de minimizar as possíveis interações eletrostáticas entre os compostos básicos e os grupos silanóis da superfície da sílica.

Portanto, através da avaliação destas misturas, tem-se que a fase estacionária preparada possui elevado potencial de aplicação para compostos farmacêuticos, realizando separações em baixo tempo de análise e com eficiência e resolução satisfatórias.

4.10.3 Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A Figura 53 apresenta os cromatogramas obtidos na separação de 10 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, utilizando-se a coluna cromatográfica preparada no laboratório e as colunas comerciais C18 Nova Pak[®] e Fenil-Hexil Zorbax[®].

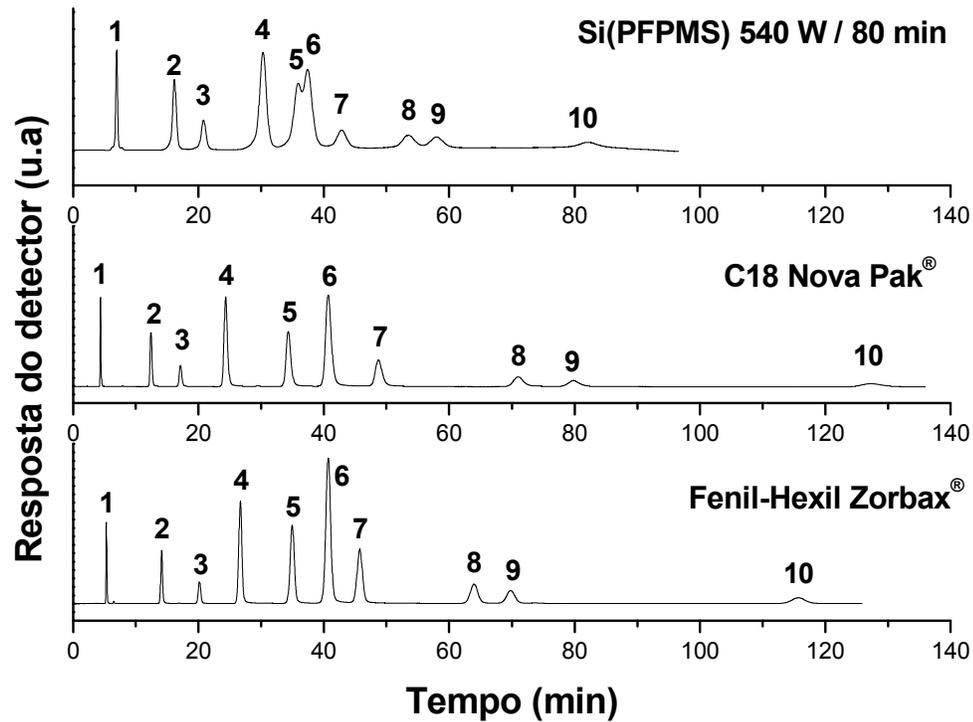


Figura 53: Cromatogramas obtidos nas análises da mistura de HPA, utilizando-se a FE Si(PFPMS) imobilizada a 540 W por 80 min e as colunas comerciais Fenil-Hexil Zorbax® e C18 Nova Pak®. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 55:45 (v/v) e vazão de 0,3 mL/min para a coluna preparada no laboratório e FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v) e vazão de 1,0 mL/min para as colunas comerciais; volume de injeção: 5 µL; detecção UV-Vis a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) benzeno, (2) naftaleno, (3) acenafileno, (4) biphenil, (5) fluoreno, (6) fenantreno, (7) antraceno, (8) fluoranteno, (9) pireno e (10) trifenileno.

A partir dos resultados obtidos para a separação dos HPA, pode-se observar que a ordem de eluição dos compostos foi a mesma, indicando que a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e as colunas comerciais apresentam as mesmas características de retenção dos compostos.

Observa-se que a FE imobilizada a 540 W por 80 min separou parcialmente os compostos fluoreno e fenantreno, ambos tricíclicos, mesmo sendo empregada uma fase móvel de menor força cromatográfica que a utilizada na análise das colunas comerciais. Provavelmente, se tivesse sido empregada uma coluna de comprimento semelhante às comerciais, poderia ter-se conseguido a separação completa destes analitos. Além disso, obteve-se elevado tempo de análise, sendo superior a 80 minutos, embora este

tenha sido inferior ao tempo de análise utilizando-se as colunas comerciais e fase móvel com maior teor de modificador orgânico.

Observando-se os cromatogramas obtidos para a separação dos compostos nas colunas comerciais, tem-se que houve separação completa de todos os HPA com boa eficiência e resolução, embora o tempo de análise tenha sido elevado (superior a 100 minutos), principalmente devido ao maior caráter hidrofóbico das fases estacionárias comerciais e ao maior comprimento das colunas. No entanto, o tempo de análise pode ser reduzido, aumentando-se a força da FM empregada, sem que haja perda na resolução e eficiência das separações.

Portanto, tem-se que a FE Si(PFPMS) possui potencialidade para ser empregada na análise dos HPA.

4.11 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias

A Figura 54 apresenta a avaliação da estabilidade química da fase estacionária sorvida com carga copolimérica de 50% e da FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, empregando-se uma fase móvel alcalina, de composição MeOH:50 mmol/L $K_2CO_3/KHCO_3$ pH 10,0 (50:50 v/v) e avaliando-se a eficiência, assimetria a 10% da altura do pico e o fator de retenção do composto naftaleno.

A fim de avaliar a estabilidade química das fases em meio alcalino, empregaram-se temperatura de 50 °C, tampão carbonato a pH 10 e com concentração de 50 mmol/L. Estas condições são consideradas drásticas e aumentam a velocidade de dissolução do suporte de sílica, diminuindo-se o tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

Para analisar a degradação do suporte de sílica em pH 10, a eficiência para o composto naftaleno foi avaliada até a obtenção de 50% da eficiência inicial da coluna, sendo que nesta condição, a separação dos compostos da MT-2 não são mais realizadas de modo satisfatório.

Além da eficiência, a queda do fator de retenção do naftaleno também foi avaliada, uma vez que sua alteração sugere a degradação da coluna cromatográfica.

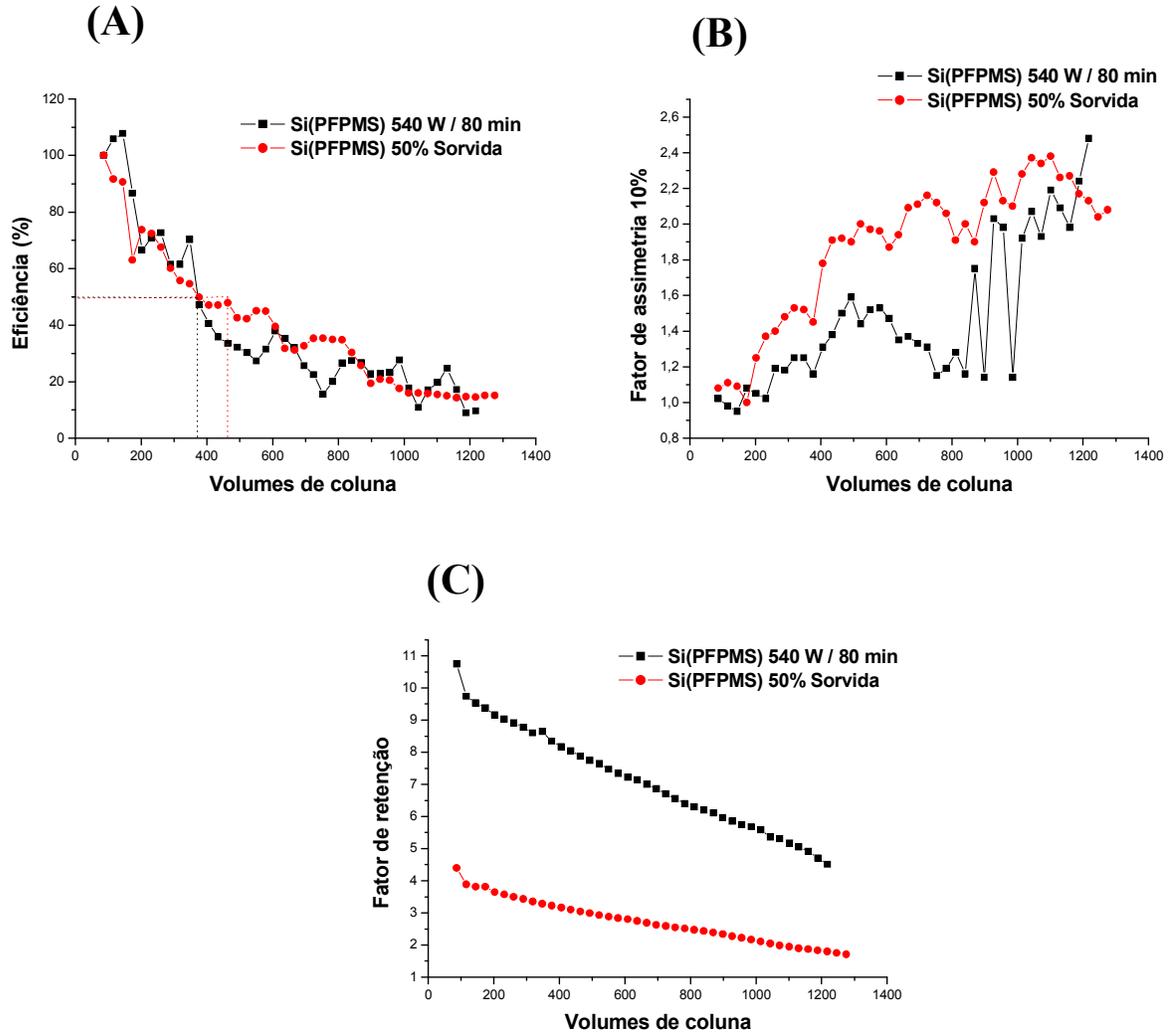


Figura 54: Avaliação da estabilidade química, em meio alcalino, das colunas cromatográficas recheadas com a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e com a FE sorvida com carga copolimérica de 50%, em termos da (A) eficiência, (B) fator de assimetria a 10% da altura do pico e (C) fator de retenção do composto naftaleno, presente na MT-2. Condições cromatográficas: FM MeOH:50 mmol/L $K_2CO_3/KHCO_3$ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm.

A Tabela 14 mostra as porcentagens de carbono das fases sorvidas e imobilizadas determinadas antes e após a realização dos testes de estabilidade em meio ácido e básico, a fim de avaliar a porcentagem de copolímero presente nas fases, após serem submetidas à condições drásticas de análise.

Tabela 14: Porcentagem de carbono obtidas para a FE sorvida a 50% e para a FE imobilizada a 540 W por 80 min, determinadas antes e após as fases serem submetidas à condições drásticas de análise em meio básico e ácido.

Fase Estacionária	Composição da Fase Móvel	% C	
		Antes Análise	Após Análise
Sorvida 50%	MeOH:50 mmol/L K ₂ CO ₃ /KHCO ₃ pH 10,0 (50:50 v/v)	26	4
Sorvida 50%	MeOH:0,1% ácido trifluoracético pH 1,7 (50:50 v/v)	26	4
540 W / 80 min	MeOH:50 mmol/L K ₂ CO ₃ /KHCO ₃ pH 10,0 (50:50 v/v)	15	15
540 W / 80 min	MeOH:0,1% ácido trifluoracético pH 1,7 (50:50 v/v)	15	11

Analisando-se os resultados obtidos para a FE sorvida com CCP de 50% e a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos tem-se que, em termos de queda na eficiência em relação ao pico do naftaleno, a FE sorvida apresentou maior estabilidade que a FE imobilizada, uma vez que resistiram à passagem de aproximadamente 460 e 370 volumes de coluna, respectivamente. Esse comportamento pode ser explicado pelo maior recobrimento copolimérico da superfície da sílica na FE sorvida, uma vez que esta FE não foi submetida à etapa de extração, apresentando maior porcentagem de carbono que a FE imobilizada, retardando a dissolução do suporte de sílica.

Em termos do fator de assimetria a 10% da altura do pico do naftaleno, tem-se que a dissolução do suporte de sílica é acompanhada por um aumento significativo do fator de assimetria. Como pode-se observar nos resultados obtidos, tem-se que ambas as fases analisadas apresentaram aumento pronunciado do fator de assimetria após ter ocorrido a perda de 50% da eficiência das colunas cromatográficas.

Avaliando-se a variação no fator de retenção do naftaleno, tem-se que ambas as fases apresentaram queda do fator de retenção do naftaleno, indicando que, além da dissolução do suporte da sílica, houve também a deterioração da fase estacionária como um todo.

Analisando-se a Tabela 14, verifica-se que a FE sorvida apresentou significativa diminuição da porcentagem de carbono, o que não foi observado para a FE imobilizada, sugerindo que a degradação da FE sorvida foi mais intensa que a da FE imobilizada.

A Figura 55 apresenta a avaliação da estabilidade química realizada para a fase estacionária sorvida com carga copolimérica de 50% e para a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos, empregando-se uma fase móvel ácida, de composição MeOH:0,1%

ácido trifluoacético pH 1,7 (50:50 v/v) e avaliando-se a eficiência, assimetria a 10% da altura do pico e o fator de retenção do composto tolueno.

O ácido trifluoroacético (TFA) é muito utilizado em análises de peptídeos e proteínas^{6,68}, que requerem o emprego de fases móveis ácidas. Este ácido orgânico é preferido frente aos ácidos inorgânicos, uma vez que não é muito agressivo às colunas cromatográficas.

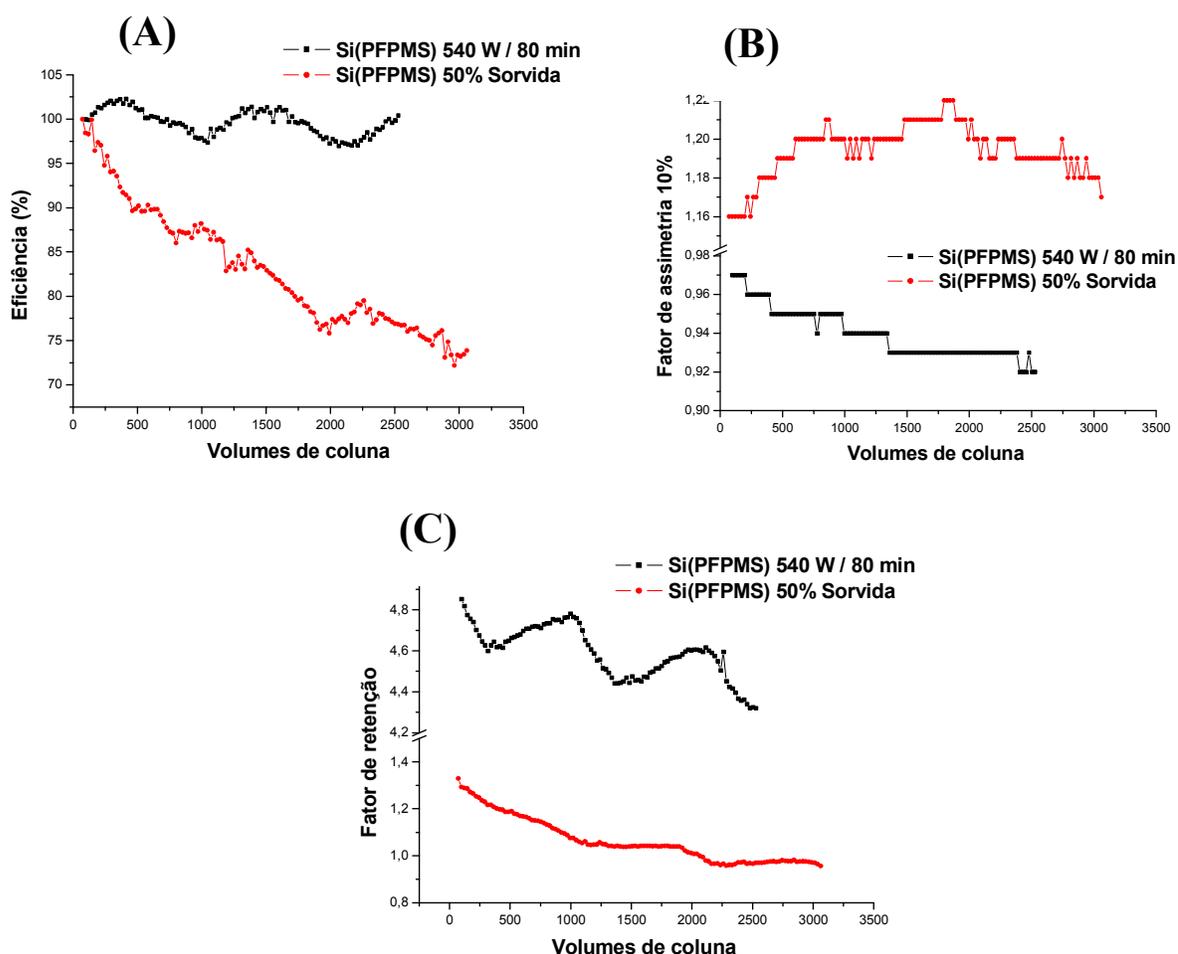


Figura 55: Avaliação da estabilidade química, em meio ácido, das colunas cromatográficas recheadas com a FE imobilizada a 540 W por 80 minutos e com a FE sorvida com carga copolimérica de 50%, em termos da (A) eficiência, (B) fator de assimetria a 10% da altura do pico e (C) fator de retenção do composto tolueno, presente na MT-1. Condições cromatográficas: FM MeOH:0,1% ácido trifluoroacético pH 1,7 (50:50 v/v), vazão de 0,5 mL/min, temperatura de 50 °C e detecção UV-Vis a 254 nm.

De modo geral, quando as fases estacionárias reversas à base de sílica são submetidas a fases móveis ácidas, ocorre a deterioração das colunas, devido à perda do ligante orgânico sorvido, imobilizado ou quimicamente ligado à superfície da sílica através da quebra das ligações siloxanos.

A partir dos resultados obtidos para a FE sorvida com CCP de 50% e para a FE sorvida e imobilizada a 540 W por 80 minutos, observa-se que, em termos de eficiência, ambas resistiram à passagem de mais de 3000 volumes de coluna, sem que ocorresse a perda de 50% da eficiência. No entanto, nota-se que a FE imobilizada apresentou maior estabilidade em meio ácido do que a FE sorvida, indicando que na FE sorvida o copolímero PFPMS está mais fracamente adsorvido na superfície da sílica. Portanto, o processo de imobilização da fase sorvida é uma etapa necessária para o aumento da estabilidade da FE. Isso pode ser comprovado também pela porcentagem de carbono das fases, conforme mostrado na Tabela 14, uma vez que a FE sorvida perde grande quantidade de copolímero quando submetida à FM ácida, enquanto que a camada copolimérica da FE imobilizada é menos agredida nas mesmas condições de análise.

Em termos de assimetria a 10% da altura do pico do tolueno, tem-se que os valores mantiveram-se na faixa aceitável pela literatura, havendo pequena variação para as duas fases estacionárias avaliadas.

Em relação ao fator de retenção para o pico do tolueno, tem-se que também houve pequena variação para as duas fases estacionárias avaliadas, indicando que ambas as fases, mesmo após a passagem de 3000 volumes de coluna, apresentam-se adequadas para a realização das separações.

A FE Si(PFPMS) imobilizada termicamente, estudada por Delmonde²⁹, também foi avaliada em termos de estabilidade em meio ácido, utilizando-se o TFA. De acordo com o estudo realizado, a FE também apresentou elevada estabilidade em meio ácido, havendo uma redução de apenas 15 % da eficiência inicial da coluna.

Portanto, através dos testes de estabilidade em meio ácido e básico, pode-se concluir que a fase imobilizada apresentou maior interação entre o suporte cromatográfico e o copolímero, enquanto que a FE apenas sorvida, embora tenha maior estabilidade em meio alcalino, por apresentar maior recobrimento polimérico, apresentou interações fracas entre o suporte e o copolímero PFPMS.

5 CONCLUSÕES

Uma FE com desempenho cromatográfico comparável ao de algumas colunas comerciais foi preparada a partir de uma carga de 50% do copolímero PFPMS, sobre o suporte de sílica Kromasil[®] de tamanho partícula principal de 5 µm e área superficial de 295 m²/g. Esta FE, após imobilização por radiação micro-ondas a 540 W por 80 minutos, apresentou eficiência de 61000 pratos/m para o composto naftaleno e parâmetros cromatográficos nos intervalos aceitos pela literatura.

A partir de misturas testes avaliadas, foi possível concluir que a FE otimizada possui atividade silanofílica e seletividade estérica baixas, seletividade hidrofóbica moderada e baixa interação com analitos polares, sendo características apropriadas para uma fase reversa empregada em CLAE.

A caracterização físico-química da fase preparada, através da técnica de RMN de ²⁹Si permitiu observar que o copolímero está sorvido, imobilizado e quimicamente ligado na superfície e poros da sílica, através dos grupos silanóis geminais, vicinais e livres. As técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e BET, comprovaram esse comportamento, além de evidenciarem que, embora o copolímero esteja na superfície e nos poros da sílica, não há a obstrução dos mesmos.

Em relação à estabilidade da FE preparada em meio ácido e básico, tem-se que as fases imobilizadas por radiação micro-ondas mostraram-se mais estáveis que as fases apenas sorvidas, uma vez que houve maior interação entre o suporte de sílica e o copolímero. A estabilidade em meio ácido da FE preparada foi comparada com a de uma FE Si(PFPMS) imobilizada termicamente, estudada por Delmonde²⁹, sugerindo que ambas as FE à base de sílica nua e do copolímero PFPMS possuem elevada estabilidade em meio ácido, empregando-se o TFA.

Em termos de aplicabilidade, tem-se que a FE preparada apresentou grande potencial na separação de diferentes classes de compostos, como agrotóxicos, fármacos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, uma vez que foi possível separar misturas destes compostos com resoluções, eficiências e tempos de análise satisfatórios.

6 REFERÊNCIAS

- 1 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 456 p.
- 2 MEYER, V. R. **Practical High Performance Liquid Chromatography**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 357 p.
- 3 LANÇAS, F. M. **Cromatografia Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 382 p.
- 4 DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
- 5 TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.
- 6 CLAESSENS, H. A.; STRATEN, M. A. V. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 23-41, 2004.
- 7 FARIA, A. M.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1385-1398, 2009.
- 8 STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; TCHAPLA, A. Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I. **Chromatographia, Supplement**, v. 53, p. S113-S131, 2001.
- 9 PETRO, M.; BEREK, D. Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 37, p. 549-561, 1993.
- 10 SEGATO, M. P. **Preparo, caracterização e aplicação de fases estacionárias de poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) sorvidas e imobilizadas sobre sílica e sílica zirconizada**. Tese de Doutorado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2011. 122 p.
- 11 QIU, H.; LIANG, X.; SUN, M.; JIANG, S. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 3307-3322, 2011.
- 12 UNGER, K. K. **Porous silica, its properties and use as support in column liquid chromatography**. Países Baixos: Elsevier Scientific Publishing Company, 1979. 336 p.

- 13 WENZEL, B.; FISCHER, S.; BRUST, P.; STEINBACH, J. Accessible silanol sites – Beneficial for the RP-HPLC separation of constitutional and diastereomeric azaspirovesamicol isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7884-7890, 2010.
- 14 SCHOLTEN, A. B.; CLAESSENS, H. A.; HAAN, J. W.; CRAMERS, C. A. Chromatographic activity of residual silanols of alkylsilane derivatized silica surface. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 37-46, 1997.
- 15 MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.
- 16 FARIA, A. M. **Desenvolvimento de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa a partir da adsorção e imobilização do poli(metiltradecilsiloxano) sobre sílica metalizada**. Tese de Doutorado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2006. 182 p.
- 17 JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. **Microchemical Journal**, v. 77, p. 191-198, 2004.
- 18 HAKY, J. E.; RAGHANI, A.; DUNN, B. M. Comparison of polybutadiene-coated alumina and octadecyl-bonded silica for separations of proteins and peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 541, p. 303-315, 1991.
- 19 SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.
- 20 FIORAVANTI, L. M. A. **Preparação e caracterização de fases estacionárias para CLAE de poli(metilfenilsiloxano) sobre sílica sorvida e imobilizada por radiação microonda**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2007. 100 p.
- 21 BOTTOLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica-poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 217-223, 2004.
- 22 BOTTOLI, C. B. G. **Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência**. Tese de Doutorado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2002. 209 p.
- 23 MORAIS, L. S. R. **Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir de sílica titanizada e polibutadieno**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2003. 95 p.

- 24 VIGNA, C. R. M. **Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2004. 85 p.
- 25 OGAYA, C. L. **Fases estacionárias de poli(metiloctilsiloxano) sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre sílicas de diferentes purezas e com diferentes pré-tratamentos.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2004. 205 p.
- 26 CHIARADIA, M. C. **Fases estacionárias reversas a base de sílica aluminizada, com poli(metiloctilsiloxano) imobilizado termicamente.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2005. 74 p.
- 27 JÚNIOR, E. S. S. **Preparação de fases estacionárias para CLAE com uma mistura de poli(dimetilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano) sorvidos e imobilizados por tratamento térmico sobre sílica.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2007. 101 p.
- 28 LOURENÇO, J. **Preparação e caracterização de fases estacionárias de dimetilmetil-fenil siloxano sobre sílica para cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2005. 52 p.
- 29 DELMONDE, M. V. F. **Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa por imobilização térmica do poli (2-fenilpropil) metilsiloxano sobre sílica.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2011. 86 p.
- 30 YANG, M.; FAZIO, S.; MUNCH, D.; DRUMM, P. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, p. 124-129, 2005.
- 31 EUERBY, M. R.; PETERSSON, P.; CAMPBELL, W.; ROE, W. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 138-151, 2007.
- 32 STEVENSON, P. G.; MAYFIELD, K. J.; SOLIVEN, A.; DENNIS, G. R.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G.; SHALLIKER, R. A. π -Selective stationary phases: (I) Influence of the spacer chain length of phenyl type phases on the aromatic and methylene selectivity of aromatic compounds in reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5358-5364, 2010.
- 33 STEVENSON, P. G.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G.; MAYFIELD, K. J.; DENNIS, G. R.; SHALLIKER, R. A. π -Selective stationary phases: (II) Adsorption behaviour of substituted aromatic compounds on n-alkyl-phenyl stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5365-5376, 2010.

- 34 KAYILLO, S.; DENNIS, G. R.; SHALLIKER, R. A. An assessment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C18 and phenyl-type surfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, p. 283-297, 2006.
- 35 STEVENSON, P. G.; KAYILLO, S.; DENNIS, G. R.; SHALLIKER, R. A. Effects of π - π interactions on the separation of PAHs on phenyl-type stationary phases. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 324-347, 2008.
- 36 HÄGGLUND, I.; JÁNAK, K.; BLOMBERG, L.; BENGARD, A.; CLAUDE, S. G.; LYMANN, M.; TABACCHI, R. Chromatographic properties of different methyl-phenyl (1:1) substituted silicone stationary phases for open-tubular gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 29, 9, p. 396-402, 1991.
- 37 JENKINS, A. D.; KRATOCHVÍL, P.; STEPTO, R. F. T.; SUTER, U. W. Glossary of basic terms in polymer science. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, p. 2287-2311, 1996.
- 38 SADICOFF, B. L.; AMORIM, M. C. V.; MATTOS, M. C. S. Uma demonstraçãõ simples e visual do efeito do aquecimento com microondas em reações de poliadichãõ. **Química Nova**, v. 23, p. 557-559, 2000.
- 39 KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. **Introduction to microwave sample preparation - theory and practice**. Washington, DC: ACS Professional Reference Book, 1940. 263 p.
- 40 SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, p. 660-667, 2002.
- 41 JIN, Q.; LIANG, F.; ZHANG, H.; ZHAO, L.; HUAN, Y.; SONG, D. Application of microwave techniques in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 479-484, 1999.
- 42 NOGUEIRA, A. R.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Digestão de Amostras Assistida por Microondas. Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/krug/Microondas%20para%20FANII.pdf>>. Acesso em: 10 de maio de 2011.
- 43 ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.
- 44 NEUE, U. D. **HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 389 p.
- 45 COLLINS, K. E.; FRANCHON, A. C.; JARDIM, I. C. S. F.; RADOVANOVIC, E.; GONÇALVES, M. C. The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance. **LC-GC - North America**, v. 18, p. 106-111, 2000.
- 46 MILESTONE. **Milestone Start E User Manual**. 2007. 58 p.

- 47 WHISTON, C. **X-ray Methods**. London: John Wiley & Sons, 1987. 426 p.
- 48 VOGUEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 488 p.
- 49 BACHMANN, S.; MELO, L. F. C.; SILVA, R. B.; ANAZAWA, T. A.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H.; ALBERT, K. Synthesis and solid-state NMR investigations of radiation-immobilized polysiloxanes on bare, titanium-grafted, and zirconium-grafted silicas. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 1874-1879, 2001
- 50 SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 437-445, 2006.
- 51 ENGELHARDT, H.; JUNGHEIM, M. Comparison and characterization of reversed phases. **Chromatographia**, v. 29, p. 59-68, 1990.
- 52 SZABÓ, G.; CSATÓ, E. Preparation and retention characteristics of different phenylpolysiloxane phases for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 463, p. 345-354, 1989.
- 53 NEUE, U. D.; SEROWIK, E.; IRANETA, P.; ALDEN, B. A.; WALTER, T. H. Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 87-100, 1999.
- 54 KIMATA, K.; IWAGUCHI, K.; ONISHI, S.; JINNO, K.; EKSTEEN, R.; HOSOYA, K.; ARAKI, M.; TANAKA, N. Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. **Journal of Chromatographic Science**, v. 27, p. 721-728, 1989.
- 55 HORAK, J.; LINDNER, W. Investigations on the chromatographic behavior of hybrid reversed-phase materials containing electron donor-acceptor systems I. Contribution of sulfur-aromatic interaction. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 177-194, 2004.
- 56 FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2004. 61 p.
- 57 FONSECA, D. A. **Desenvolvimento de um novo procedimento de avaliação da estabilidade de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2001. 105 p.
- 58 JARDIM, I. C. S. F.; MALDANER, L.; LOURENÇO, J.; FIORAVANTI, L. M. A.; COLLINS, C. H. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 2917-2929, 2010.
- 59 KIRKLAND, J. J.; VAN, S. M. A.; CLAESSENS, H. A. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 691, p. 3-19, 1995.

- 60 INNOCENZI, P. Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. **Journal of Non-Crystalline Solids** v. 316, p. 309-319, 2003.
- 61 LIPP, E. D. Measurement of trace silanol in siloxanes by IR spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 45, p. 477-483, 1991.
- 62 TRAMMELL, B. C.; MA, L.; LUO, H.; HILLMYER, M. A.; CARR, P. W. Synthesis and characterization of hypercrosslinked, surface-confined, ultra-stable silica-based stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 61-76, 2004.
- 63 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.
- 64 NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora Unicamp, 2007. 480 p.
- 65 MALDANER, L. **Fases estacionárias de poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizadas sobre suportes de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Preparo e Caracterização**. Tese de Doutorado. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 2010. 84 p.
- 66 ANAZAWA, T. A.; JARDIM, I. C. S. F. The chromatographic behavior of coated stationary phases with different silicas. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, p. 645-655, 1998.
- 67 BRANDOLINI, A. J.; HILLS, D. D. **NMR Spectra of Polymers and Polymer Additives**. New York: Marcel Dekker, 2000. 635 p.
- 68 CHEN, Y.; MEHOK, A. R.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 9-18, 2004.