



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS A BASE DE SÍLICA  
ALUMINIZADA, COM POLI(METILOCTILSILOXANO)  
IMOBILIZADO TERMICAMENTE**

**Autora: Mariza Campagnolli Chiaradia**

**Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins**

**Campinas  
Julho de 2005**

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

C43f Chiaradia, Mariza Campagnolli.  
Fases estacionárias reversas à base de sílica  
aluminizada, com Poli (Metiloctilsiloxano) imobilizado  
termicamente / Mariza Campagnolli Chiaradia. --  
Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Carol H. Collins.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Fase estacionária. 2. Sílica. 3. Alumina. 4. CLAE.  
I. Collins, Carol H. II. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Reversed phases based on aluminized silica, with Poly (Methyloctylsiloxane) immobilized by thermal treatment

**Palavras-chave em inglês:** Stationary phase, Silica, Alumina, HPLC

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química Analítica

**Banca examinadora:** Carol H. Collins (Orientadora), Susanne Rath; Marina Franco Maggi Tavares; Kenneth Elmer Collins

**Data de defesa:** 27/07/2005

Dedico esta dissertação aos meus pais, João e Édna, que me ensinaram a sempre fazer o meu melhor para atingir meus objetivos e que me deram a oportunidade de realizar este sonho. Dedico também ao meu namorado, Kleber, pela compreensão, apoio e incentivo, mas principalmente por ter sido meu verdadeiro companheiro durante todo o caminho que percorri para chegar até aqui.

## Agradecimentos

- Agradeço primeiramente à Deus que me deu o dom da vida e tem abençoado minha caminhada neste mundo com amor, saúde e paz.
- À minha família e ao Kleber pelo amor, incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos.
- À Profa Carol pelo exemplo de profissionalismo, humildade, competência e também por toda atenção, apoio e pelos sábios ensinamentos que com certeza levarei comigo por toda minha vida. Foi um privilégio realizar este trabalho sob sua orientação. Muito obrigada.
- Ao Prof Kenneth pelas idéias, sugestões e colaboração com informações preciosas para a realização deste trabalho.
- À minha amiga Karen que esteve sempre disposta a me ajudar. Hoje em dia é muito difícil encontrar pessoas tão honestas e sinceras como você. Obrigada, amiga!
- Aos meus amigos e colegas do laboratório: Zahra, Carla, Edivan, Lúcio, Nilva, Dania, Lúcia, Priscila, Louise, Daniel, Elias, Laís, Camila, Liane, Dione, Josimara, Anízio, Lika, Christien, Vanessa e Alessandra, pela agradável convivência.
- Ao César, à Zahra e à Nilva pelas sugestões e ajuda com a utilização dos equipamentos.
- Ao Prof José Salvador Barone pela gentil realização das análises por FAAS.
- Aos funcionários do Instituto de Química por toda ajuda e colaboração.
- À UNICAMP e ao Instituto de Química pela estrutura oferecida para a realização de estudos e trabalhos.
- À CAPES pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

# CURRICULUM VITAE

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

### ***Bacharel em Química Analítica com atribuições Tecnológicas***

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Período: 03/1999 a 12/2002

### ***Mestrado em Química Analítica***

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Período: 08/2003 a 07/2005

Título da Dissertação: “Fases Estacionárias Reversas a Base de Sílica Aluminizada, com Poli(metiloctilsiloxano) Imobilizado Termicamente”

## ATIVIDADES ACADÊMICAS

### ***Iniciação Científica***

- Projeto: “Desenvolvimento de Procedimentos para Incorporação de Alumina em Partículas Porosas de Sílica para sua Utilização como Suporte em CLAE”

Instituição financiadora: Pibiq/SAE

Orientadora: Prof. Dra. Carol H. Collins (Instituto de Química – Unicamp)

Período: 08/2000 a 07/2002

### ***Participação em congressos***

- 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques  
Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; “Aluminized silica-based reversed phases prepared with thermally-immobilized poly(methyloctylsiloxano)”, (2005) Estocolmo – Suécia.
- 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química  
Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; “Fases Estacionárias Reversas a Base de Sílica Aluminizada, com Poli(metiloctilsiloxano) Imobilizado Termicamente”, (2005) Poços de Caldas (MG) – Brasil.
- Seventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry

Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; "FAAS Determination of Aluminum Oxide Chemically Bonded to Chromatographic Silica", (2002) Florianópolis (SC) – Brasil.

- X Congresso Interno de iniciação Científica

Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; "Incorporação de alumina em partículas de sílica para sua utilização como suporte em CLAE", (2002) Campinas (SP) – Brasil.

- 11º ENQA: Encontro Nacional de Química Analítica

Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; "Procedimentos de incorporação de alumina em partículas de sílica para sua utilização como suporte em CLAE", (2001) Campinas (SP) – Brasil.

- IX Congresso Interno de iniciação Científica

Trabalho: Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; "Desenvolvimento de procedimentos para incorporação de alumina em partículas porosas de sílica para sua utilização como suporte em CLAE", (2001) Campinas (SP) – Brasil.

### ***Outras atividades***

- Participação no Programa de Estágio Docente (PED) - 1º semestre de 2005

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Disciplina: Química Analítica I

Professora Responsável: Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

### **ATIVIDADES PROFISSIONAIS**

- Empresa: Novotex Sul Americana

Cargo: Química auxiliar no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Laminados Sintéticos

Período: 30/09/2002 a 24/09/2003

- Empresa: Nestlé do Brasil Ltda

Cargo: Estagiária no Laboratório de Garantia da Qualidade

Período: 07/2002 a 08/2002

## **FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS A BASE DE SÍLICA ALUMINIZADA, COM POLI(METILOCTILSILOXANO) IMOBILIZADO TERMICAMENTE**

**Autora:** Mariza Campagnolli Chiaradia

**Orientadora:** Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram preparadas e avaliadas fases estacionárias (FE) utilizando sílica modificada com alumina como suporte e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) imobilizado por tratamento térmico em sua superfície, com o objetivo de se obter fases estáveis e eficientes para o uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa (FR) como alternativa às FE à base de sílica pura. A influência da temperatura e tempo de reação na quantidade de alumina incorporada na superfície da sílica foram estudados. Os resultados mostraram que uma maior porcentagem de alumina é obtida sobre a sílica quando a reação com isopropóxido de alumínio é realizada por 8 h à 80 °C. Para se obter uma boa cobertura polimérica dos grupos hidroxila do suporte foram aplicados diferentes tempos e temperaturas para imobilização térmica do PMOS sobre o suporte. Os resultados cromatográficos mostraram que é obtida uma FE com bom desempenho quando submetida a imobilização à 120 °C por 8 h. Uma FE obtida sob estas condições apresentou um comportamento cromatográfico semelhante a uma FE comercial à base de alumina e uma maior estabilidade quanto à dissolução do suporte quando submetida a passagem de FM alcalina, se comparada a uma FE baseada em sílica pura.

# REVERSED PHASES BASED ON ALUMINIZED SILICA, WITH POLY(METHYLOCTYLSILOXANE) IMMOBILIZED BY THERMAL TREATMENT

**Author:** Mariza Campagnolli Chiaradia

**Supervisor:** Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

In this work stationary phases using silica modified with alumina (as support) with poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) immobilized on its surface (as liquid stationary phase) were prepared and evaluated, with the objective of obtaining stable and efficient stationary phases (SP) for use in Reversed Phase (RP) High Performance Liquid Chromatography (HPLC), as an alternative to SP based on pure silica. The influence of temperature and reaction time on the amount of alumina incorporated on the silica surface was studied. The results showed that the greatest aluminium percentage on silica was obtained when the reaction with aluminium isopropoxide was carried out for 8 h at 80 °C. In order to obtain a good polymeric covering of the support hydroxyl groups, different times and temperatures for the thermal immobilization of PMOS onto the support were used. The chromatographic evaluations indicate that the SP with the best performance was that where the PMOS was immobilized at 120 °C for 8 h. A SP obtained under these thermal treatment conditions showed chromatographic behaviour similar to that of a commercial alumina-based reversed-phase chromatographic column and greater stability in a basic mobile phase than a SP prepared with silica not modified with alumina.

# ÍNDICE GERAL

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1- Fases estacionárias utilizadas em CLAE .....	<b>2</b>
1.2- A sílica .....	<b>2</b>
1.3- Fases estacionárias quimicamente ligadas .....	<b>5</b>
1.4- Fases estacionárias quimicamente ligadas à base de siloxanos .....	<b>7</b>
1.5- Fases estacionárias reversas alternativas .....	<b>9</b>
1.6- Caracterização das fases estacionárias .....	<b>12</b>
1.7- Parâmetros cromatográficos .....	<b>13</b>
1.8- Estabilidade das fases estacionárias .....	<b>16</b>
<b>2- Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<b>3- Parte Experimental</b> .....	<b>20</b>
3.1- Materiais .....	<b>20</b>
3.1.1- Reagentes e solventes .....	<b>20</b>
3.1.2- Suportes cromatográficos .....	<b>21</b>
3.1.3- Fase estacionária líquida .....	<b>21</b>
3.1.4- Colunas e fases estacionárias comerciais avaliadas .....	<b>21</b>
3.2- Equipamentos .....	<b>22</b>
3.3- Otimização das condições de preparo da sílica aluminizada .....	<b>23</b>
3.4- Preparo dos suportes cromatográficos de sílica aluminizada (Si-Al) .....	<b>24</b>
3.5- Determinação da porcentagem de alumínio na sílica aluminizada (Si-Al) .....	<b>25</b>
3.6- Caracterização físico-química dos suportes cromatográficos .....	<b>25</b>
3.6.1- Determinação da área superficial ( $S_{BET}$ ), volume ( $v_p$ ) e diâmetro médio dos poros ( $d_p$ ) .....	<b>25</b>
3.6.2- Teste de estabilidade da sílica aluminizada em soluções ácidas e básicas .....	<b>26</b>
3.6.3 - Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM) .....	<b>27</b>

3.7- Preparo das fases estacionárias -----	27
3.7.1- Sorção da fase líquida -----	27
3.7.2- Imobilização das fases estacionárias por tratamento térmico -----	27
3.7.3- Extração do excesso de polímero -----	28
3.8- Caracterização físico-química das fases estacionárias -----	29
3.8.1- Espectroscopia no infravermelho -----	29
3.8.2- Determinação da área superficial, volume e tamanho de poros (ASAP) -----	29
3.8.3 – Análise elementar de carbono -----	29
3.8.4- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) -----	30
3.9- Polimento e confecção das colunas cromatográficas -----	30
3.10- Enchimento das colunas com as fases estacionárias -----	31
3.10.1- Preparo da suspensão de fase estacionária para o enchimento -	31
3.10.2- Enchimento das colunas cromatográficas -----	31
3.10.3- Condicionamento das colunas -----	32
3.11- Preparo da fase móvel -----	33
3.12- Avaliação cromatográfica -----	33
3.13- Avaliação da estabilidade de fases estacionárias -----	34
<b>4- Resultados e Discussão -----</b>	<b>35</b>
4.1- Otimização das condições de preparo da sílica aluminizada -----	35
4.2- Caracterização físico-química da sílica YMC-Gel -----	36
4.3- Caracterização físico-química dos suportes cromatográficos de sílica YMC-Gel e Kromasil aluminizadas -----	37
4.4- Testes de estabilidade da sílica aluminizada em soluções ácidas e básicas - -----	40
4.5- Avaliações cromatográficas das fases estacionárias comerciais -----	41
4.6- Avaliações físico-químicas e cromatográficas das fases estacionárias de PMOS imobilizado termicamente sobre o suporte YMC-AI-3 -----	44
4.6.1- Fases estacionárias de PMOS imobilizadas termicamente sobre YMC-AI-3 6 dias após o preparo da fase sorvida -----	44

4.6.2- Fase estacionária de PMOS imobilizado termicamente sobre YMC-Al-3 14 dias após o preparo da fase sorvida -----	51
4.7- Avaliações físico-químicas e cromatográficas das fases estacionárias a base de sílica Kroamsil aluminizada -----	52
4.7.1- Avaliações cromatográficas em fase normal das fases à base de sílica Kromasil aluminizada -----	53
4.7.2- Avaliações físico-químicas e cromatográficas em fase reversa das fases à base de sílica Kromasil aluminizada -----	54
4.7.2.1- Avaliações das fases estacionárias com massa inicial específica de aproximadamente 1 -----	54
4.7.2.2- Avaliações da FE obtida utilizando-se uma maior massa inicial específica -----	60
4.7.2.3- Avaliações da fase estacionária obtida a partir da técnica de pulso de aquecimento -----	62
4.8- Teste de estabilidade da fase estacionária K-2Al(PMOS) em pH 9,0 -----	64
<b>5- Conclusões -----</b>	<b>69</b>
<b>6- Referências Bibliográficas -----</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espécies químicas presentes na sílica. -----	<b>4</b>
<b>Figura 2:</b> Reações para o preparo de fases estacionárias quimicamente ligadas. -----	<b>6</b>
<b>Figura 3:</b> Reações químicas utilizadas para a obtenção de fases estacionárias quimicamente ligadas. Reação dos silanóis da superfície da sílica com (a) clorodimetilsilanos; (b) silanos trifuncionais; (c) alcoxisilanos trifuncionais. -----	<b>8</b>
<b>Figura 4:</b> Comatograma com medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos. -----	<b>13</b>
<b>Figura 5:</b> Determinação da assimetria do pico. -----	<b>16</b>
<b>Figura 6:</b> Descrição do sistema de enchimento de colunas cromatográficas. -----	<b>32</b>
<b>Figura 7:</b> Microscopia de Varredura Eletrônica da sílica YMC-Gel com aumento de a) 350 vezes e b) 1100 vezes. -----	<b>36</b>
<b>Figura 8:</b> Espectro de <sup>29</sup> Si (CP/MAS) NMR da sílica YMC-Gel nua. -----	<b>37</b>
<b>Figura 9:</b> Porcentagem de alumínio perdida pela sílica aluminizada dos lotes YMC-AI-1 (a) e YMC-AI-2 (b) em função do tempo, nas diferentes condições de pH à que foram submetidos. -----	<b>40</b>
<b>Figura 10:</b> Cromatogramas obtidos utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: comercial Kromasil C-8 5 µm; FM: MeOH:H <sub>2</sub> O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min <sup>-1</sup> ; detecção UV a 254 nm; compostos: a) 1- uracil, 2- acetona, 3- benzonitrila, 4- benzeno, 5-tolueno, 6- naftaleno b) 1- uracil, 2- fenol, 3- N,N-dimetilanilina, 4- naftaleno 5-acenafteno. -----	<b>42</b>
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas obtidos utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: comercial à base de alumina 5 µm; FM: MeOH:H <sub>2</sub> O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min <sup>-1</sup> ; detecção UV a 254 nm; compostos: a) 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4-tolueno, 5- naftaleno b) 1- uracil, 2- fenol, 3- N,N-dimetilanilina, 4- naftaleno, 5-acenafteno. -----	<b>43</b>
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas correspondentes as fases de PMOS imobilizadas por 8 h à 140°C (a), 120°C (b) e 100°C (c) sobre YMC-AI-3. Condições cromatográficas: Coluna	

de 60 x 3,9 mm; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno. -----45

**Figura 13:** Cromatogramas correspondentes as fases de PMOS imobilizadas por 16 h à 140°C (a), 120°C (b) e 100°C (c) sobre YMC-Al-3. Condições cromatográficas: Coluna de 60 x 3,9 mm; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno. -

-----47

**Figura 14:** Espectros de infravermelho da sílica YMC-Gel (a), sílica aluminizada YMC-Al-3 (b) e fase de PMOS imobilizado à 120°C por 8 h sobre a sílica aluminizada YMC-Al-3(PMOS) (c). -----50

**Figura 15:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: PMOS imobilizado termicamente à 120 °C por 8 h 14 dias após o preparo da fase sorvida sobre YMC-Al-3 ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4-tolueno, 5- naftaleno. -----51

**Figura 16:** Cromatogramas obtidos utilizando colunas de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al (a) e K-Al (b); FM: hexano:etanol (95:5 v/v),; vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- benzeno, 2- benzoato de etila, 3- benzonitrila, 4- álcool benzílico. -----53

**Figura 17:** Cromatogramas obtidos utilizando-se colunas de 60 x 3,9 mm, FE: (a) K-2Al(PMOS) e (b) K-Al(PMOS); FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno. -----55

**Figura 18:** Cromatogramas obtidos utilizando-se colunas de 60 x 3,9 mm, FE: (a) K-2Al(PMOS) e (b) K-Al(PMOS); FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- fenol, 2- naftaleno, 3- N,N-dimetilanilina, 4- acenafteno. -----56

**Figura 19:** Espectros de <sup>29</sup>Si (CP/MAS) NMR da sílica Kromasil (a) e da fase estacionária K-2Al(PMOS) (b). -----59

**Figura 20:** Estrutura das espécies Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> e Q<sup>4</sup> presentes no espectro de <sup>29</sup>Si (CP/MAS) NMR da sílica Kromasil e da fase estacionária K-2Al(PMOS), e D<sup>1</sup>, D<sup>1</sup><sub>H</sub>, D<sup>2</sup> e D<sup>2</sup><sub>H</sub> presentes apenas no espectro de K-2Al(PMOS). -----60

**Figura 21:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al(PMOS) com  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,2$  ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno. -----**61**

**Figura 22:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub> ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno. -----**63**

**Figura 23:** Teste de estabilidade (a) eficiência, (b) resolução e (c) fator de retenção em fase movel básica de metanol: 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> / NaOH, pH 9 (50:50 v/v), à 60 °C e vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Avaliações feitas para o naftaleno (a,c) e o par tolueno-naftaleno (b). -----**66**

**Figura 24:** Teste de estabilidade para a fase SiO<sub>2</sub>(PMOS) à 60 °C em função do pH da fase movel. Condições do teste de estabilidade: FM metanol 0,1 mol L<sup>-1</sup> e solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> (50:50 v/v) com diferentes pH, usando uma vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Condições de avaliação: FM metanol-água (70:30 v/v), vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno. -----**68**

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características das sílicas utilizadas como suporte cromatográfico, segundo dados dos fabricantes. -----	<b>21</b>
<b>Tabela 2:</b> Porcentagens em massa de alumínio obtidas nas amostras de sílica Rainin aluminizadas em diferentes temperaturas. -----	<b>35</b>
<b>Tabela 3:</b> Porcentagens em massa de alumínio e número de átomos de alumínio por silanol do suporte nos diferentes lotes de sílica YMC-Gel e Kromasil aluminizadas. ---	<b>38</b>
<b>Tabela 4:</b> Valores obtidos por ASAP de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) para YMC-Al-3, K1Al e K-2Al. Dados de $S_{BET}$ , $d_p$ e $v_p$ fornecidos pelo fabricante para as sílicas Kromasil e YMC-Gel. -----	<b>39</b>
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 7a para a fase C-8 comercial a base de sílica Kromasil. -----	<b>42</b>
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 7b para a fase C-8 comercial a base de sílica Kromasil. -----	<b>43</b>
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 11a para a fase comercial a base de alumina 5 $\mu\text{m}$ . -----	<b>44</b>
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 11b para a fase comercial a base de alumina 5 $\mu\text{m}$ . -----	<b>44</b>
<b>Tabela 9:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos para a fase YMC-Al-3(PMOS) obtida por imobilização à 120 °C por 8 h (figura 12b). -----	<b>46</b>
<b>Tabela 10:</b> Valores de massa específica de PMOS e espessura da camada polimérica formada após a imobilização térmica do PMOS sobre a sílica aluminizada (YMC-Al-3) por 8 h e 16 h, seguida de sua extração com hexano. -----	<b>48</b>
<b>Tabela 11:</b> Atribuições [52] às bandas dos espectros de infravermelho da sílica YMC-Gel, da sílica aluminizada YMC-Al-3 e da fase termicamente imobilizada à 120°C por 8 h YMC-Al-3(PMOS). -----	<b>49</b>
<b>Tabela 12:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos para a fase YMC-Al-3(PMOS) obtida por imobilização a 120 °C por 8 h, 14 dias após o preparo da fase sorvida (figura 15). -- -----	<b>52</b>

<b>Tabela 13:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 17a para a fase K-2Al(PMOS). -----	<b>55</b>
<b>Tabela 14:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 18a para a fase K-2Al(PMOS). -----	<b>56</b>
<b>Tabela 15:</b> Valores de massa específica ( $m_{\text{PMOS}}$ ) e espessura de camada polimérica sobre o suporte ( $\tau$ ) calculados pelas equações X, XI, XII e XIII, a partir dos resultados obtidos pela análise elementar de carbono das fases K-Al(PMOS) e K-Al-2(PMOS), e valores de área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) obtidos por ASAP para estas mesmas fases estacionárias e seus respectivos suportes K-Al e K-2Al. -----	<b>58</b>
<b>Tabela 16:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 21 para a fase K-2Al(PMOS) com $m_{\text{PMOS}}^i = 1,2$ . -----	<b>61</b>
<b>Tabela 17:</b> Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 22 para a fase K-2Al(PMOS) <sub>pulso</sub> . -----	<b>63</b>

# 1- INTRODUÇÃO

Dentre os métodos cromatográficos modernos de análise química, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ocupa lugar de destaque por proporcionar facilidade na separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma, ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. Utilizando-se a CLAE é possível analisar misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, iônicos e ionizáveis, e substâncias de alta a baixa massa molar com boa detectabilidade, além de oferecer a possibilidade de automação.

Graças a sua versatilidade, atualmente a CLAE tem sido aplicada como técnica analítica em diversas áreas científicas e de aplicação orientada como ciências biológicas, alimentícia, polímeros sintéticos e química ambiental, assim como na padronização e validação de métodos de análise aplicados nas áreas farmacêutica e clínica [1].

A cromatografia é um método físico-químico de separação que consiste no arraste da amostra por uma fase móvel (FM) sobre uma fase estacionária (FE), de maneira que os componentes da amostra são separados de acordo com as diferenças em seus coeficientes de distribuição entre as duas fases, que leva à migração diferencial destes componentes.

Em CLAE, a FM é um líquido bombeado sobre altas pressões através de uma pequena coluna recheada com FE, a qual pode ser um sólido ou um líquido depositado sobre um suporte sólido. Para detectar a composição do eluato (FM + componente da amostra) existem vários detectores, que são colocados na saída da coluna, capazes de identificar e quantificar os componentes da amostra.

As separações em CLAE dependem fundamentalmente da composição da FM e da FE. A FE, devido às suas propriedades de superfície, exerce papel decisivo nos mecanismos de separação, e é o desenvolvimento destes materiais que pode resultar em avanços tanto na eficiência quanto na especificidade das separações.

## 1.1- Fases estacionárias utilizadas em CLAE

As fases estacionárias utilizadas em CLAE podem ser Fases Normais (FN), as quais são mais polares que a FM, ou Fases Reversas (FR), que são menos polares que a FM.

Fases Reversas (FR) são as fases estacionárias mais comumente usadas em CLAE. É estimado que em cerca de 80-90% das separações realizadas por CLAE são empregadas FR [1]. A sua popularidade deve-se à versatilidade desta modalidade, uma vez que proporciona um rápido equilíbrio entre as fases, gera tempos de retenção reprodutíveis e os princípios básicos de retenção podem ser facilmente compreendidos [2].

As FR são compostas de um líquido com caráter apolar e um suporte cromatográfico sólido, poroso e finamente particulado. Frequentemente, o suporte possui em sua superfície grupos polares, como grupos hidroxila, aos quais a parte líquida pode estar ligada covalentemente [3,4] ou, ainda, pode estar sorvida [5-8] ou imobilizada [9-15] como uma camada orgânica polimérica nos poros e na superfície do suporte.

## 1.2- A sílica

A maioria das FE utilizadas em CLAE são baseadas em suportes de sílica porosa [16], pois esta é rígida, permitindo a obtenção de colunas com leitos homogêneos e estáveis sob altas pressões por longos períodos, é estável quimicamente frente a vários solventes, possui uma grande área superficial, é disponível com grande variedade de diâmetros de poros (6-10 nm), tamanho de partícula (1-10  $\mu\text{m}$ ) e possui grupos silanóis ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) que possibilitam a modificação de sua superfície através da reação destes grupos com reagentes apropriados, para produzir fases estacionárias com diferentes tipos de seletividade.

Para aplicações em CLAE, micropartículas porosas esféricas de 5 e 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio de partículas e, em menor extensão, partículas de 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro,

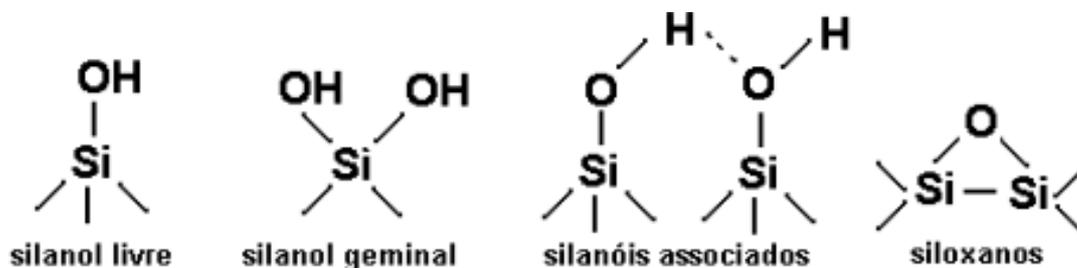
são preferidas nas modernas tecnologias de coluna, porque formam leitos cromatográficos mais homogêneos, estáveis e permeáveis. Pequenas partículas de 1 e 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula (porosas ou não) têm sido introduzidas para separações rápidas de biopolímeros que, por causa de seu tamanho, têm pobres características de difusão. Grandes diâmetros de partícula, geralmente entre 10 e 25  $\mu\text{m}$ , são usados em Cromatografia Líquida Preparativa e foram usadas inicialmente em separações sob baixa pressão [17].

As partículas de sílica são também empregadas de acordo com sua estrutura de poros, que é caracterizada pelo diâmetro médio de poros, área superficial e volume de poros. Esses parâmetros podem ser determinados por métodos já bem estabelecidos como, por exemplo, fisiosorção de gases ou vapores. A área superficial pode ser medida considerando-se os poros ou somente a área superficial externa das partículas. Porém, quando se realiza a medida da área superficial com os poros pode-se considerar a importante relação: quanto maior a área superficial, menor o diâmetro dos poros [17,18].

Sílicas com diâmetro médio de poros entre 5 -15 nm e área superficial de 150 - 600  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  são mais utilizadas na separação de compostos com baixa massa molar, enquanto sílicas com diâmetro médio de poros maiores que 30 nm são aplicadas à separação de biopolímeros, pois assim não é restrito o acesso do soluto na FE. Microporos são particularmente indesejáveis, porque eles podem causar o efeito de exclusão das partículas pelo tamanho ou adsorção irreversível. São denominados microporos poros com diâmetro menor que 3 nm, mesoporos aqueles com diâmetro de 3 a 5 nm e macroporos com diâmetro maior que 50 nm [17].

A matriz da sílica é formada por ligações siloxano e na sua superfície estão presentes grupos silanóis livres ou isolados, vicinais ou associados e geminais [19], como ilustrado na figura 1. Desta maneira, tem-se que as propriedades da sílica pura dependem da estrutura de seus poros e da atividade química da sua superfície, a qual está relacionada à concentração e distribuição dos diferentes tipos de grupos silanóis e à presença de grupos siloxanos [20].

Os diferentes tipos de silanóis da superfície da sílica possuem atividades adsorptivas diferentes, isto é, apresentam diferentes reatividades ou diferentes graus de acidez. Silanóis isolados são considerados os mais ativos. A concentração total de silanóis na superfície é de  $8,0 \pm 1,0 \mu\text{m m}^{-2}$  para as sílicas utilizadas em CLAE, valor este considerado por alguns autores como constante físico-química [20,21]. Mas diferentes sílicas podem conter diferentes quantidades relativas dos diferentes silanóis em sua superfície, que podem ser, até certo ponto, controladas através do processo de rehidroxilação da superfície da sílica. Numa sílica que contém sua superfície completamente hidroxilada (máximo de hidroxilação da superfície) há um maior número de silanóis associados, pois os grupos silanóis estão mais próximos uns dos outros e se unem pela ligação de hidrogênio, fazendo com que a acidez da superfície da sílica seja reduzida. Sílicas que possuem baixas concentrações de grupos silanóis em sua superfície contém uma concentração de grupos silanóis livres relativamente alta, os quais são mais ácidos [20,21].



**Figura 1:** Espécies químicas presentes na sílica.

Estudos realizados por Nawrocki e colaboradores [22-24] mostraram a existência de uma pequena população de grupos silanóis fortemente ativos na superfície da sílica, mais ácidos que os outros tipos de silanóis, podendo ser até 50 vezes mais reativos que um sítio comum. A causa da forte acidez apresentada por estes silanóis está, provavelmente, relacionada a presença de impurezas metálicas na matriz da sílica que influenciam indiretamente nas propriedades cromatográficas através do aumento da acidez dos silanóis vizinhos, ou diretamente, reagindo com reagentes complexantes contidos na FM.

O mecanismo pelo qual as impurezas metálicas geram um aumento na acidez de silanóis vizinhos é bem conhecido em estudos de catálise, nos quais óxidos binários são utilizados em processos que necessitam de fortes sítios de adsorção. Elementos multivalentes como o Al, Fe, Zr, Ti e La são conhecidos como agentes de sítios de forte adsorção, pois a fraca ligação de hidrogênio na superfície da sílica (ácido de Bronsted) compensa a menor carga formal destes átomos de metal, por exemplo, do alumínio (+3), comparada com a do átomo de silício (+4) da matriz da sílica.

Teoricamente, uma sílica pura apresenta pKa de  $7,1 \pm 0,5$ , mas valores de pKa de 1,5 até 10 podem ser observados. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas com o método de síntese da sílica e também com a matéria prima de partida que pode deixar mais ou menos resíduos na matriz da sílica. Grandes variações na acidez da sílica têm sido notadas, não apenas de sílica provenientes de diferentes fabricantes, mas também de um lote para outro de um mesmo fabricante [23].

### **1.3- Fases estacionárias quimicamente ligadas**

Os silanóis da superfície da sílica podem reagir com os mais diferentes agentes para produzir as chamadas fases estacionárias quimicamente ligadas (FL). As FL consistem de hidrocarbonetos ou outros grupos orgânicos ligados covalentemente aos grupos do suporte. Estas fases foram introduzidas por Kirkland e colaboradores [25,26] na década de 70 pois, até então, utilizava-se líquidos imiscíveis na FM e depositados em um suporte sólido, como fases estacionárias havendo, portanto, a dificuldade de se manter o líquido sobre o suporte devido às altas pressões a que é submetida a FE no processo cromatográfico.

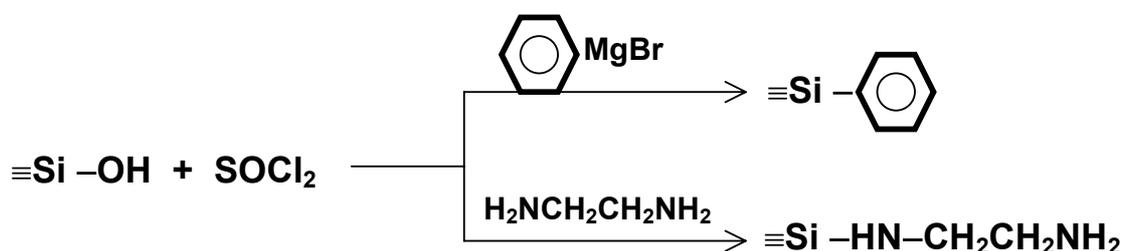
Um dos primeiros métodos desenvolvidos para obtenção de FL consistia na modificação de um suporte a base de sílica com uma camada orgânica monomolecular de um álcool, como ilustrado na figura 2(a) [27]. Estas fases eram freqüentemente preparadas pela esterificação direta dos grupos silanóis da sílica (Si-OH) com um álcool (R-OH) ou pela cloração do suporte com cloreto de tionila, para posterior reação com o álcool. A esterificação da sílica com álcool resultava em fases denominadas

"brushes" (escovas), as quais apresentavam boa eficiência para as separações por CLAE. Porém, a pobre estabilidade hidrolítica destas fases limitou sua utilização quando CLAE-FR com FM aquosa tornou-se popular [27].

(a) sílica esterificada



(b) sílica-carbono e sílica-nitrogênio



(c) siloxanos



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

Simultaneamente ao desenvolvimento das fases de sílica esterificada, foram desenvolvidas as fases estacionárias de silicone polimérico com diferentes funcionalidades, boa estabilidade térmica e hidrolítica. Porém, estas fases possuíam uma densa camada polimérica que ocasionava uma lenta transferência de massa dos solutos, resultando em eficiência reduzida e picos menos simétricos, especialmente sob alta velocidade de fluxo da FM [27].

FE com ligações Si-C ou Si-N foram desenvolvidas na tentativa de eliminar algumas das desvantagens das fases de sílica esterificada. Este tipo de FE era preparado pela cloração dos grupos silanóis da sílica com cloreto de tionila, seguido da reação com um reagente de Grignard para produzir ligações Si-C ou com aminas para

se obter ligações Si–N, como mostrado na figura 2(b) [27]. Estas FE possuíam uma melhor estabilidade hidrolítica que as fases de sílica esterificada. Porém as reações com compostos de Grignard resultavam em relativamente baixas concentrações de ligantes na superfície do suporte, além de deixar resíduos indesejáveis na FE obtida. Já as FE com ligação Si–N tinham sua aplicação limitada ao intervalo de pH de 4 a 8 quando FM aquosas eram utilizadas.

## **1.4- Fases estacionárias quimicamente ligadas à base de siloxanos**

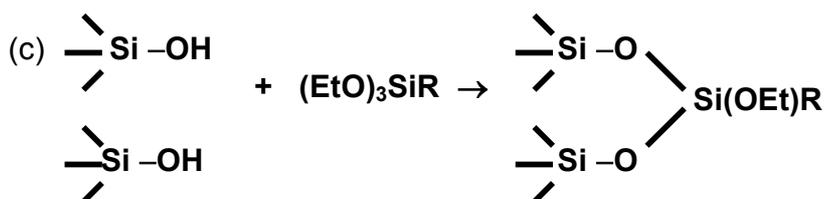
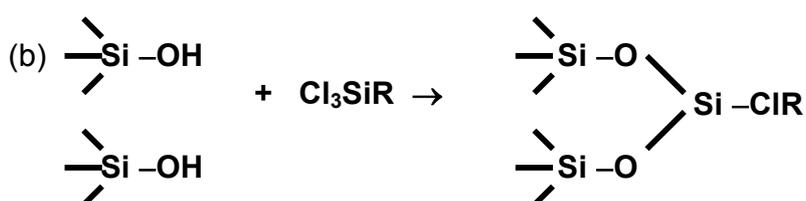
As FE mais amplamente utilizadas são as FL à base de siloxanos [27]. Estas fases são preparadas pela reação entre os grupos silanóis da superfície do suporte de sílica com reagentes organossilanos, formando ligações siloxano, como é mostrado na figura 2(c). Estes reagentes possuem grupos reativos como cloro ou alcóxido e grupos R, na sua maioria formados por 8 ou 18 átomos de carbono [28].

As colunas comerciais mais utilizadas são recheadas com FL à base de siloxanos obtidas à partir de reagentes monofuncionais, como mostrado na figura 3(a). Colunas recheadas com fases monofuncionais apresentam elevada eficiência por que a configuração espacial da camada polimérica formada favorece a rápida cinética de difusão do analito para dentro e para fora da camada orgânica. Mas algumas fases comerciais são obtidas a partir da reação do suporte com silanos bifuncionais ou trifuncionais, como ilustrado na figura 3(b) e 3(c).

FE poliméricas são, muitas vezes, mais estáveis que as tradicionais fases monofuncionais. Porém, é difícil a produção de FE poliméricas uniformes, de maneira que a sua retenção e seletividade são mais variáveis que das fases monofuncionais [27].

Era de se esperar que a utilização de reagentes monofuncionais levasse à reação destes reagentes com o máximo número de grupos silanóis da superfície da sílica. Porém, geralmente mais de 50% dos grupos silanóis do suporte permanecem sem reagir devido ao impedimento estérico gerado pelos grupos laterais das cadeias

dos organossilanos [27]. Os silanóis que permanecem sem reagir com a fase orgânica são denominados silanóis residuais, os quais são acessíveis à interação com os analitos durante a separação cromatográfica [21,29]. Por serem ácidos, os silanóis residuais interagem fortemente com solutos básicos, gerando picos com cauda [21] e, em casos extremos, podem adsorver irreversivelmente estes compostos.



**Figura 3:** Reações químicas utilizadas para a obtenção de fases estacionárias quimicamente ligadas. Reação dos silanóis da superfície da sílica com (a) clorodimetilsilanos; (b) silanos trifuncionais; (c) alcoxisilanos trifuncionais.

Além do problema com os silanóis residuais, as FL à base de siloxanos que utilizam sílica como suporte têm sua aplicação limitada a um pequeno intervalo de pH, uma vez que em fases móveis com pH maiores que 8 a sílica pode se solubilizar rapidamente, causando um decréscimo drástico na eficiência da coluna, aumento da assimetria do pico e, eventualmente, gerando o colapso do leito da coluna [19]. Já em solução ácida as fases quimicamente ligadas sofrem hidrólise da ligação siloxano [1] e, por isso, não devem ser utilizadas em pH menor que 2. Desta forma, as FL à base de siloxanos que utilizam a sílica como suporte têm seu uso restrito a uma faixa de pH no intervalo de 2 a 8.

## 1.5- Fases estacionárias reversas alternativas

Na busca por colunas com alta eficiência, boa estabilidade e possibilidade de regeneração, surgiram várias alternativas para minimizar os problemas das fases reversas convencionais (fases reversas quimicamente ligadas a base de siloxanos utilizando sílica como suporte), à partir de modificações realizadas na fase líquida e/ou no suporte, assim como no procedimento de adição de fase orgânica na superfície do suporte.

Buscou-se o melhoramento da estabilidade das fases à base de siloxanos por meio de vários processos cujo objetivo era reduzir a vulnerabilidade das ligações siloxano em meio ácido. Um desses processos foi denominado capeamento [27], o qual consistia na realização de uma segunda reação de silanização do suporte com grupos de baixa massa molar, como triclorometilsilanos e trimetilclorosilanos. Em geral, o processo de capeamento aumenta o tempo de vida útil das fases à base de siloxanos, porém, diferenças encontradas em estudos de estabilidade aos quais foram submetidas fases capeadas nominalmente idênticas, indicam que somente o capeamento não é capaz de melhorar a estabilidade química destas fases. Ou seja, a estabilidade química das fases à base de siloxanos depende também de outros fatores como a natureza da sílica utilizada como suporte e da cobertura polimérica formada sobre a superfície da sílica [1].

Outra tentativa de melhorar a estabilidade das fases à base de siloxanos foi a obtenção de fases monoméricas estericamente protegidas através da substituição dos grupos metila, laterais às cadeias dos reagentes organosilanos utilizados na obtenção de fases monoméricas, por grupos volumosos como isopropil ou terc-butil. Estes grupos, graças ao seu volume, protegem estericamente a ligação siloxano da hidrólise em meio ácido [1], assim como reduzem a interação silanofílica aumentando a estabilidade destas fases em meio alcalino [11].

Fases estacionárias com grupos polares embutidos na cadeia da fase ligada, como amidas, carbamatos, sulfamidas e uréias, podem melhorar a eficiência e a estabilidade da coluna. Recentemente, Kirkland desenvolveu uma fase estacionária

com grupos alquilamida embutidos e protegida estericamente. Esta fase apresentou boa resistência à hidrólise em pH baixo e, ao mesmo tempo, boa performance e estabilidade em FM com pH intermediário [27].

Uma outra alternativa para obtenção de fases estacionárias com maior estabilidade é pela sorção e imobilização de um polímero líquido na superfície de um suporte apropriado usando temperatura, radiação  $\gamma$ , adição de peróxidos ou outros processos de entrecruzamento [9]. Os polisiloxanos [5-11], como o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) e o poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), os poliestirenos [30,31], os polibutadienos [13,14,32] e os poliacrilatos [32] são exemplos de fases líquidas poliméricas usadas na preparação destas fases estacionárias.

Bottoli e colaboradores [33] observaram que, em temperatura ambiente, o PMOS sorvido nos poros da sílica aumenta sua retenção à medida que aumenta o tempo de repouso entre a preparação da FE e o enchimento da coluna. Este processo leva à formação de uma camada de PMOS imobilizada sem uso de agente externo, presumidamente devido ao rearranjo das moléculas de PMOS em uma configuração favorável à adsorção por multi-pontos ao suporte, por isso foi denominado auto-imobilização [12]. Imobilizações térmicas realizadas durante 2 e 4 horas, de FE sorvidas, utilizando diferentes temperaturas, mostraram que até 120 °C é promovida a formação de uma monocamada polimérica sobre o suporte, produzindo fases com melhores eficiências [11,16]. Entretanto para temperaturas maiores que 150 °C foram obtidas bicamadas, resultando em um decréscimo no desempenho cromatográfico, uma vez que a densa camada polimérica formada bloqueia os poros do suporte dificultando a difusão do analito através da FE [10].

As fases imobilizadas apresentaram um maior recobrimento da superfície do suporte que as fases quimicamente ligadas [9]. Porém, este maior recobrimento não é capaz de impedir a dissolução do suporte das fases imobilizadas à base de sílica quando expostas a fases móveis alcalinas. Mas a estabilidade destas fases estacionárias frente a fases móveis básicas é efetivamente aumentada quando se utiliza como suporte a alumina [30,34,35], zircônia [30,32] e titânia [36], assim como a sílica modificada com óxido de zircônio ou titânio [8,15,37,38].

Os óxidos de alumina, zircônia e titânia são materiais promissores como suportes cromatográficos devido a alta estabilidade hidrolítica destes óxidos em uma faixa mais ampla de pH quando comparados à sílica nua [1], aliada à uma elevada resistência mecânica.

A estabilidade hidrolítica apresentada pela zircônia no intervalo de pH de 0 a 14 fez com que as FR obtidas à partir deste óxido apresentassem elevada estabilidade química e térmica em vários estudos realizados. Por exemplo, fases de zircônia recobertas com uma camada de polímero aromático permanecem estáveis durante a passagem de uma substancial quantidade de FM de pH ácido e básico à 160 °C e fases de zircônia recobertas com polibutadieno podem ser utilizadas em pH 14 à 195 °C durante a passagem de até 6000 volumes de coluna de FM sem apresentar nenhum sinal de deterioração [1].

A titânia, além da grande estabilidade hidrolítica, apresenta grande homogeneidade superficial, de maneira que em um estudo realizado com uma fase de titânia recoberta com grupos octadecil, esta FE apresentou poucos grupos hidroxila residuais (Ti-OH) resultando em picos simétricos na separação de compostos básicos como anilinas e fenilaminas em FM neutra [39].

Outro óxido com propriedades interessantes para fins cromatográficos é a alumina ( $Al_2O_3$ ), um óxido básico, assim como os óxidos de titânio e zircônio, e que é, portanto, insolúvel em meio alcalino. Além disso, a alumina possui uma superfície com acidez notavelmente reduzida, o que pode reduzir ainda mais a atividade dos grupos hidroxila residuais, e é estável em um grande intervalo de pH (pH 1 -13) [34]. Partindo de partículas de alumina esféricas e utilizando o procedimento desenvolvido por Schomburg e colaboradores, a empresa Merck GmbH (Darmstadt, Germany) desenvolveu uma FE denominada Aluspher RP-Select B. Trata-se de uma FE de polibutadieno imobilizado sobre as partículas de alumina que, segundo o fabricante, é muito estável em soluções ácidas, neutras e básicas, sendo recomendada principalmente para a separação de compostos básicos [1].

Recentemente em nosso laboratório (LabCrom - Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida) foram desenvolvidas FE de PMOS imobilizado sobre partículas de sílica modificada com zircônia [8,37] e titânia [15,38]. O uso de suportes de sílica

modificada com óxidos inorgânicos torna-se interessante porque possibilita aliar as características desejáveis da sílica disponível comercialmente, como área superficial, porosidade e tamanho de partícula, com a funcionalidade química da superfície de outros óxidos.

As FE com suporte de sílica titanizada e zirconizada apresentaram uma maior estabilidade química que FE à base de sílica preparadas pelo mesmo procedimento quando submetidas por longos períodos de tempo à passagem de FM alcalina sob temperatura de 60 °C [1,11,41,42]. O desempenho cromatográfico das FE à base de sílica titanizada e zirconizada também foi melhor quando comparada às fases com suporte de sílica, sendo obtidos picos mais simétricos na separação de compostos básicos [15]. Estes estudos indicam que o uso de suportes de sílica modificada com metais, aliados a obtenção de uma boa cobertura polimérica por meio de técnicas de imobilização, leva à redução da atividade dos sítios ácidos da superfície do suporte e à obtenção de FE com melhores estabilidade química e desempenho cromatográfico que as fases convencionais quimicamente ligadas.

A modificação de partículas de sílica gel com alumina já vem sendo estudada para fins catalíticos [44] e pode se tratar de um promissor suporte para fins cromatográficos, uma vez que a alumina é um óxido estável em um grande intervalo de pH, possui características cromatográficas e de superfície similares às da titânia e da zircônia.

## 1.6- Caracterização das fases estacionárias

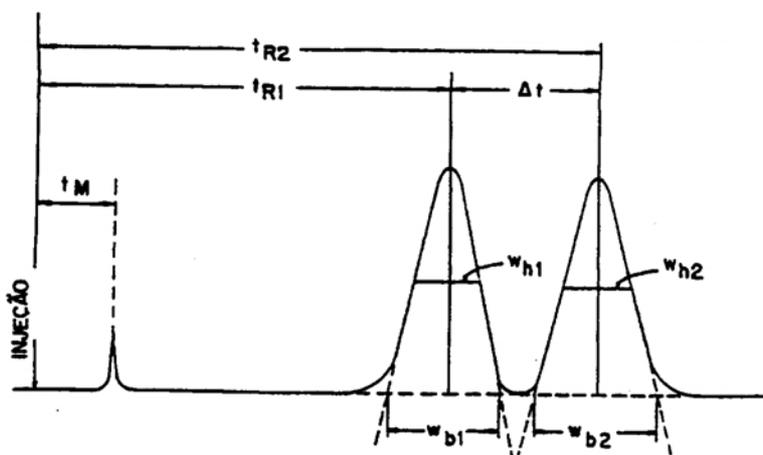
A necessidade de distinguir as propriedades físicas e químicas de tantas fases estacionárias em desenvolvimento levou os pesquisadores a utilizarem diversas técnicas para realizar a caracterização destas fases, a fim de se determinar aquelas mais adequadas para uma determinada separação. As técnicas e métodos empregados para caracterizar as fases estacionárias podem ser divididos em:

- **Técnicas químicas:** Abrangem a análise elementar e métodos químicos de determinação dos grupos silanóis.

- **Técnicas físicas:** Englobam as técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho, Raman e Fotoeletrônica de Raios-X), Termogravimetria, determinação de área superficial, volume de poros e Microscopia Eletrônica.
- **Caracterização Cromatográfica:** Envolve a caracterização através de parâmetros cromatográficos e avaliação com misturas testes específicas.
- **Testes de Estabilidade:** Submete-se as FE de interesse a condições experimentais drásticas de pH, natureza e concentração do modificador orgânico da FM e temperatura durante certo período de tempo. Durante o teste são monitorados parâmetros cromatográficos como eficiência, assimetria e fator de retenção para avaliar a deterioração das fases em função do tempo de exposição às condições drásticas.

## 1.7- Parâmetros cromatográficos

Para se avaliar o desempenho cromatográfico de uma fase estacionária é calculada uma série de parâmetros cromatográficos à partir de valores extraídos do cromatograma. A figura 4 mostra um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes.



**Figura 4:** Cromatograma com medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos.

- **Tempo de retenção ( $t_R$ ):** é o tempo gasto desde o momento da injeção do soluto até a saída do cume do pico correspondente.
- **Tempo de retenção de um componente não retido na FE ( $t_M$ ):** é o tempo que um composto não retido pela FE gasta para percorrer o sistema cromatográfico, desde a injeção até a chegada no detector.
- **Tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ):** é o tempo que o soluto fica retido na FE, calculado pela equação I.

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

- **Fator de retenção ( $k$ ):** é calculado pela razão entre os tempos em que o soluto fica retido na FE e na FM, sendo obtido pela equação II.

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (II)$$

Os valores ideais de  $k$  devem variar entre 2 e 10, pois valores menores que 2 indicam pouca interação do soluto com a FE e valores maiores que 10 significam que há uma forte interação do soluto com a FE, provocando um longo tempo de análise [17].

- **Resolução entre picos ( $R_s$ ):** refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculado pela equação III.

$$R_s = 2 [(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b1} + w_{b2})] = 1,777 [(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})] \quad (III)$$

onde:  $t_{R2}$  e  $t_{R1}$  = tempos de retenção de dois picos adjacentes

$w_{b1}$  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

Valores de  $R_s$  acima de 1,5 são considerados ideais, indicando uma boa separação entre os picos.

- **Eficiência ( $N$ ):** a eficiência da coluna cromatográfica é avaliada através do número de pratos, que representa as etapas de equilíbrio do analito entre a FE e a FM. Quanto maior o número de etapas de equilíbrio em uma coluna, melhor a separação. Na prática  $N$  é uma medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito atravessa o sistema cromatográfico. Este parâmetro é calculado pela equação IV.

$$N = 5,545 (t_R / w_h)^2 = 16 (t_R / w_b)^2 \quad (IV)$$

Como existem colunas com diferentes comprimentos, é usual expressar a eficiência em número de pratos por metro (N/m), como mostrado na equação V.

$$N/m = N/L \quad (V)$$

onde: L = comprimento da coluna em metros

A avaliação comparativa entre colunas pode ser feita utilizando a medida da altura equivalente a um prato (H), que é calculada pela equação VI.

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

Plotando-se H versus  $\mu$  (velocidade linear da FM) obtém-se uma curva que é conhecida como curva de van Deemter. Esta curva mostra que existe uma vazão ótima ( $\mu_{ótima}$ ), na qual H terá um valor mínimo correspondente ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, determina-se a  $\mu_{ótima}$  variando-se a velocidade de fluxo no sistema cromatográfico.

- **Altura reduzida (h):** duas colunas de mesmas dimensões recheadas com partículas de diâmetros diferentes podem ter sua eficiência comparada utilizando-se a altura reduzida, calculada segundo a equação VII.

$$h = H/d_p \quad (VII)$$

onde:  $d_{part}$  é o diâmetro da partícula

Valores ideais de h devem estar entre 2 e 4, indicando separações eficientes [45].

- **Fator de assimetria do pico a 10% da sua altura (As):** é a medida da proporção entre duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal a 10% da altura do pico. Se o pico não é simétrico, diferentes valores serão calculados para N (medidas errôneas) porque a medida da largura não seguirá a distribuição Gaussiana. O valor de As deve estar no intervalo de 0,9 a 1,2, mas valores de 0,8 até 1,6 também são admitidos [46]. A figura 5 mostra como é realizado o cálculo da assimetria de um pico.

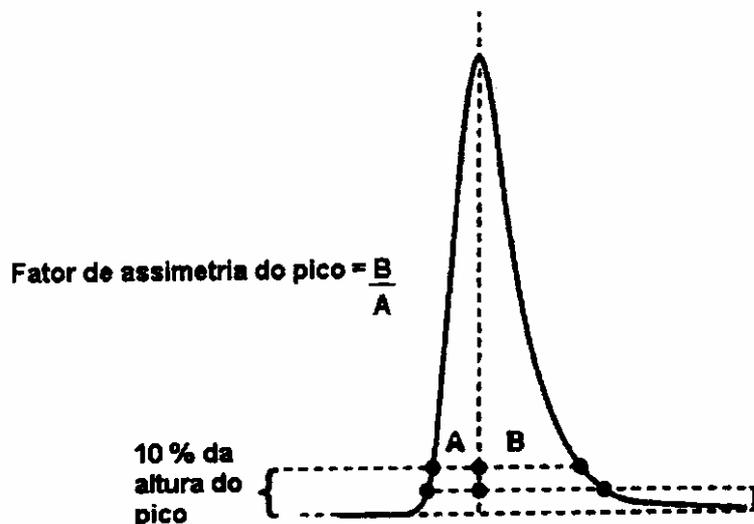


Figura 5: Determinação da assimetria do pico.

## 1.8- Estabilidade das fases estacionárias

O material de recheio de uma coluna cromatográfica é considerado estável quando suas características cromatográficas permanecem inalteradas por um período de tempo relativamente longo, diminuindo a frequência de troca da coluna. O tempo de vida útil de uma coluna é determinado pela degradação da sua capacidade de separação cromatográfica e depende da perda sofrida tanto em relação a retenção quanto a resolução que pode ser tolerada antes que seja necessário trocar a coluna [41,42].

A estabilidade das FE depende fundamentalmente das condições de análise, como temperatura, pH, tipo e concentração do tampão, e do modificador orgânico empregado na FM [1,41,42].

Atualmente para o desenvolvimento de métodos de análise cromatográfica rápidos e eficientes são empregados eluentes agressivos sob condições de temperatura elevadas pois, sob estas condições, muitas vezes são obtidas melhores seletividade, eficiência, resolução, redução do consumo de solvente e tempo de

análise. Porém, o emprego de condições drásticas de análise geram a necessidade do uso de FR com maior estabilidade química e térmica.

Portanto, para garantir a escolha de colunas resistentes às condições de análise, a estabilidade química das FR é investigada colocando-as em contato com eluentes agressivos. Durante o processo são monitoradas alterações nos parâmetros cromatográficos, como fator de retenção, eficiência e assimetria, para componentes específicos de uma mistura teste [1]. Porém, não há um método padrão estabelecido para avaliar a estabilidade de FE [1,41,42], sendo que a maioria dos procedimentos desenvolvidos utilizam grandes volumes de FM e são muito lentos [42].

O controle da temperatura é de grande importância nas análises por CLAE, pois a temperatura influencia muitos parâmetros físicos relevantes, como a viscosidade, difusibilidade do analito na FM e FE, e também a solubilidade da amostra. Consequentemente, estes parâmetros determinam a pressão que deverá ser aplicada ao sistema, eficiência, retenção e seletividade de FE. Em temperaturas elevadas, em consequência do abaixamento da viscosidade, pode ser utilizado um significativo aumento na velocidade do eluente, resultando numa drástica diminuição no tempo de retenção. O aumento da temperatura também ocasiona um aumento na difusibilidade dos analitos na FM e FE, o que resulta em melhores valores de eficiência e assimetria. Desta forma, o uso de elevadas temperaturas nas separações por CLAE geram melhores resoluções, diminuição do tempo de análise e da quantidade de FM utilizada [1]. Mas é sabido que o uso de temperaturas maiores ou iguais a 40 °C reduzem significativamente o tempo de vida útil de colunas recheadas com FR convencionais [42].

A concentração e tipo de tampão empregado para controle do pH nas FM também afeta a estabilidade das colunas cromatográficas. Em um estudo realizado por Claessens e colaboradores para avaliar o efeito do tipo do tampão empregado, foi utilizada uma coluna Zorbax RX-C18 e FM acetonitrila / solução tampão pH 7 (20:80 v/v) com vazão de 1,0 ml min<sup>-1</sup> à 60 °C. Neste estudo foi verificado que tampões de sais de borato e glicina, quando misturados ao modificador orgânico, geram alterações relativamente pequenas no pH da FM, enquanto tampões de fosfato e carbonato causam um aumento de 0,65 e 1,4 unidades de pH, respectivamente. Desta forma, em

pH elevados, o uso de tampões de sais de carbonato e fosfato reduzem o tempo de vida útil das colunas recheadas com FE convencionais à base de sílica, uma vez que aceleram o processo de dissolução da sílica [1]. O uso de elevadas concentrações de tampão na FM também acelera o processo de dissolução da sílica, de maneira que é indicado o uso de sais tampões em concentrações inferiores à  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  [1,41].

O modificador orgânico utilizado na FM também pode ser agressivo à FE, como por exemplo, o uso de metanol ao invés de acetonitrila como modificador orgânico acelera o processo de dissolução da sílica [1,41].

Recentemente, foi desenvolvido no LabCrom um método rápido de análise da estabilidade química e térmica de FR quimicamente ligadas e imobilizadas, utilizando FM com pH 8,4 ou 10,0 (metanol -  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$ , 50:50 volume/volume), em temperatura igual a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  com velocidade de fluxo de FM de 0,6 ou  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , com injeções periódicas dos compostos testes dissolvidos na mesma FM. Este método permite realizar análises rápidas com consumo reduzido de reagentes [42]. Utilizando este método, Fonseca e colaboradores determinaram que colunas comerciais de fases quimicamente ligadas (Hyperosil ODS e NovaPak C<sub>18</sub>) se mantiveram estáveis durante a passagem de 250 mL de FM em pH 10,0, o que é equivalente ao volume de solvente usado durante aproximadamente 6 meses de trabalho cromatográfico de rotina em pH menor ou igual a 9,0, com concentração de sal de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , à temperatura ambiente. Já uma FE de PMOS, imobilizado sobre suporte de sílica modificada com óxido de zircônio começou a degradar após a passagem de 600 mL de FM sob as mesmas condições, mostrando que a modificação do suporte de sílica com zircônia, aliada ao entrecruzamento das cadeias do PMOS previnem a rápida dissolução do suporte de sílica mesmo em condições de elevados pH e temperatura [42].

Para as FR convencionais (quimicamente ligadas à base de sílica) o primeiro sinal de degradação da coluna em pH elevado é, normalmente, uma redução no fator de retenção (k). Entretanto, para FR mais estáveis o k permanece relativamente constante em pH básico, ainda que a dissolução da sílica tenha se iniciado. Mas sua degradação pode ser identificada por perdas no desempenho cromatográfico que levam a uma redução da eficiência e aumento no fator de assimetria dos picos [41].

Desta forma, uma maneira eficiente de se monitorar a degradação de uma FE é plotando-se a eficiência ou assimetria para um determinado analito em função dos volumes de coluna (capacidade volumétrica da coluna cromatográfica) de FM que atravessam a coluna cromatográfica avaliada.

## 2- OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo a síntese de fases estacionárias de PMOS imobilizado termicamente sobre sílica aluminizada, como proposta de fase estacionária reversa alternativa a fases estacionárias à base de sílica. Para tanto, buscou-se estabelecer as condições ótimas para a síntese destas fases, e realizar posteriormente a sua caracterização por meio de testes químicos, físicos e cromatográficos, além de se determinar a estabilidade destas fases quando submetidas a condições drásticas de análise, como pH e temperatura elevados.

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

- Modificação química da superfície da sílica com isopropóxido de alumínio;
- Avaliação da estabilidade da sílica aluminizada em soluções ácidas e básicas;
- Avaliação cromatográfica da sílica aluminizada utilizando o modo FN;
- Sorção do polímero na superfície do suporte de sílica aluminizada;
- Estudo do efeito da temperatura e do tempo no processo de imobilização térmica do polímero sorvido no suporte para sua otimização;
- Avaliação do suporte de sílica aluminizada e das FE imobilizadas através de testes físicos e químicos, tais como: Espectroscopia de Absorção Atômica; determinação do diâmetro médio e volume específico dos poros, Microscopia Eletrônica de Varredura, Análise Elementar, Espectroscopia no Infravermelho e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear;
- Avaliação do desempenho cromatográfico das FE obtidas através do uso de misturas padrões;
- Avaliação da estabilidade da melhor FE obtida em meio básico.

## 3- PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1- Materiais

#### 3.1.1- Reagentes e solventes

- Acenafeno, Aldrich
- Acetona p.a., Merck
- Ácido clorídrico p.a., Merck
- Ácido nítrico p.a., Synth
- Água deionizada, sistema Milli-Q Plus, Millipore
- Álcool benzílico p.a., Synth
- Benzeno p.a., Synth
- Benzoato de etila p.a., Synth
- Benzonitrila p.a.; Riedel - de Haën
- Bicarbonato de sódio p.a., Alkimia
- Clorofórmio p.a., Merck
- Diclorometano p.a., Merck
- Etanol grau cromatográfico, Tedia
- Fenol p.a., Ecibra
- Hexano grau cromatográfico, Tedia
- Hidróxido de sódio grau analítico, Fisher
- Isopropóxido de alumínio, Aldrich
- Metanol grau cromatográfico, Mallinckrodt
- Naftaleno p.a., Carlo Erba
- N,N-dimetilanilina p.a., Quimex
- Tolueno p.a., Merck
- Uracil, Aldrich

### 3.1.2- Suportes cromatográficos

As características das sílicas utilizadas como suporte cromatográfico neste trabalho encontram-se especificadas na tabela 1, de acordo com os dados fornecidos pelos fabricantes. As sílicas utilizadas apresentam formato de partículas esférico.

**Tabela 1:** Características das sílicas utilizadas como suporte cromatográfico, segundo dados dos fabricantes.

Especificações	Tipos de sílica		
	YMC-Gel (YMC Co.)	Kromasil (Eka Nobel)	Rainin (Varian)
Diâmetro médio de partícula ( $\mu\text{m}$ )	15,3	5	5
Área superficial específica $S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	344	330	195
Volume de poro ( $\text{mL g}^{-1}$ )	1,02	0,89	0,6
Diâmetro médio de poros (nm)	12	11,3	10,0

### 3.1.3- Fase estacionária líquida

Como líquido estacionário, foi utilizado poli(metiloctilsiloxano), PMOS, Petrarch Systems - Hüls America, lote nº 145-04, com viscosidade 600 a 1000 centistokes a 25 °C, densidade de  $0,91 \text{ g cm}^{-3}$ , massa molar por peso médio de 6200 (dados fornecidos pelo fabricante).

### 3.1.4- Colunas e fases estacionárias comerciais avaliadas

Utilizou-se a fase estacionária comercial Kromasil C-8  $5 \mu\text{m}$  (Azo Nobel), à base de sílica, e a coluna comercial LiChroCART 250-4 Aluspher 100 RP-select B  $5 \mu\text{m}$

(Merck), à base de alumina, para comparar o desempenho cromatográfico destas com os das fases obtidas a partir da imobilização térmica do PMOS nos suportes de sílica aluminizada.

### 3.2- Equipamentos

- Agitador magnético, Corning, modelo PC-351
- Agitador roto-torque, Cole Parmer Instrument Company, modelo 7637-10
- Agitador Vórtex, Phoenix, modelo AP 56
- Analisador Elementar, Perkin Elmer, modelo CHN-2400
- Balança Analítica (sensibilidade de 0,0001 g), Fisher Scientific, modelo A-250
- Bomba a vácuo, Marconi, modelo 2107VG20TFEL-120A
- Bomba para extração, Waters, modelo 510
- Bomba de enchimento de colunas com faixa de pressão de 6,9 a 207,0 MPa (1000 a 30000 Psi), Haskel, modelo 51769
- Centrífuga, Fisher Scientific, modelo 225
- Cromatógrafo a líquido para avaliação cromatográfica das colunas, composto por: Bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Waters, modelo 510; Detector UV/Vis, de comprimento de onda variável, Alltech, modelo 450; Injetor, Rheodyne, com alça de amostragem de 10  $\mu$ L, modelo 7725i; Sistema de aquisição de dados composto por um microcomputador do tipo PC Pentium II 400 MHz, com software de aquisição e tratamento de dados cromatográficos Crom Perfect for Windows, versão 3.52 e Report Write Plus de Justice Innovations.
- Cromatógrafo a líquido utilizado para a realização dos testes de estabilidade em condições agressivas, composto por: Bomba de alta pressão tipo recíproca de pistão duplo, Shimadzu, modelo LC-10 A; Auto injetor com amostragem programada de 10  $\mu$ L, Shimadzu, modelo SIL-10 AD; Detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis, de comprimento de onda variável, Shimadzu, modelo SPD-10 A; Forno para Coluna, Shimadzu, modelo CTO-10 AS; Controlador de sistema, Shimadzu,

modelo SCL-10 A e Sistema de aquisição de dados composto por um microcomputador do tipo PC, com software de aquisição de dados cromatográficos Class VP da Shimadzu

- Espectrômetro de Absorção Atômica, Varian, modelo AA 6
- Espectrômetro de Infravermelho, Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, Bruker AC, 300 MHz
- Estufa, Yamato, modelo ADP 21
- Forno tubular, EDG, modelo 10P-S, equipado com sistema para fluxo de nitrogênio
- Forno, Eldex, modelo CH-150
- Geladeira, General Electric
- Medidor da área superficial, Micromeritics, modelo ASAP-2010
- Microscópio de Varredura Eletrônica, JEOL, modelo JSM-T300
- pH metro, Digimed, modelo DC 21
- Ultra som, Thornton, modelo T 14

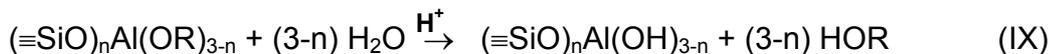
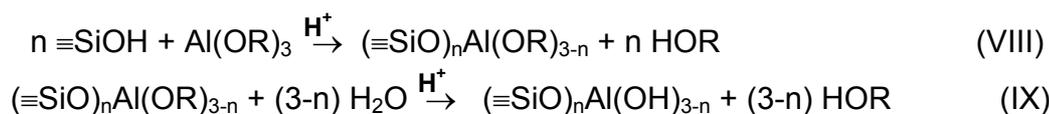
### **3.3- Otimização das condições de preparo da sílica aluminizada**

Para a realização deste procedimento utilizou-se a sílica Rainin, a qual foi seca em estufa à 150 °C durante cerca de 24 h para remoção da água fisicamente adsorvida. Em seguida, foi colocada em uma dessecador até alcançar a temperatura ambiente, para então ser pesada em porções de 1 g em vários frascos de vidro. A cada frasco de vidro foi adicionado 1,5 mL de uma solução de isopropóxido de alumínio em tolueno 1,6 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi agitada em um agitador de tubos (Vórtex) até que se observou a formação de uma mistura uniforme e, em seguida, foi centrifugada por cerca de 10 minutos a fim de se remover o ar do interior dos poros da sílica, permitindo então, que a solução de reagente penetrasse nos poros. Depois, os frascos foram colocados no ultra-som por cerca de 10 minutos, também com o intuito de eliminar o ar

do interior das partículas de sílica e permitir uma maior interação da solução de reagente com os silanóis da superfície da sílica.

As misturas de sílica com a solução de isopropóxido de alumínio foram submetidas a diferentes condições de temperatura: 20 °C, 40 °C, 60 °C e 80 °C (frascos mantidos em estufa). Estes frascos foram mantidos em cada uma das temperaturas durante 8 h. Transcorrido o tempo determinado, o sólido foi lavado 3 vezes com tolueno para retirar o excesso de reagente e deixado na capela para evaporar o solvente. Os grupos isopropóxido resultantes na superfície da sílica foram hidrolizados por meio da adição de uma solução de  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de ácido nítrico. O sólido foi mantido em contato com a solução de ácido por cerca de 24 h e então foi lavado com água deionizada e seco em estufa à 110 °C por uma noite.

As reações químicas envolvidas no processo de aluminização da sílica são descritas pelas equações VIII e IX.



### **3.4- Preparo dos suportes cromatográficos de sílica aluminizada (Si-Al)**

Para obtenção dos suportes de sílica aluminizada, utilizou-se o mesmo procedimento descrito no processo de otimização das condições de preparo de sílica aluminizada, fixando-se o tempo de reação em 8 h e a temperatura em 80 °C. Foram submetidos individualmente ao processo de aluminização três lotes de sílica YMC-Gel, (YMC-AI-1, YMC-AI-2 e YMC-AI-3).

Submeteu-se também ao processo de aluminização um lote de sílica Kromasil, que em seguida foi dividido em duas porções. Uma das porções foi reservada (K-AI) e a outra foi submetida mais uma vez ao processo de modificação com isopropóxido de alumínio (K-2AI).

### **3.5- Determinação da porcentagem de alumínio na sílica aluminizada (Si-Al)**

Os vários lotes de sílica aluminizada obtidos foram submetidos à análise por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) para se determinar a porcentagem de alumínio presente em cada lote. O procedimento de determinação de alumínio na sílica foi desenvolvido e realizado gentilmente pelo professor José Salvador Barone no laboratório de análises Puriquima Ltda. Três diferentes métodos foram utilizados para realizar a solubilização da sílica aluminizada:

- a) tratamento a quente com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HF}$  (3:1 v/v), secagem e posterior dissolução em  $\text{HCl}$ ;
- b) fusão oxidativa com  $\text{NaOH}$  e  $\text{Na}_2\text{O}_2$  seguida por dissolução em  $\text{HCl}$ ;
- c) digestão em uma mistura de  $\text{HCl}$  e  $\text{HNO}_3$  (3:1 v/v) utilizando o sobrenadante para determinação direta;

O volume da solução resultante da solubilização da sílica aluminizada foi ajustado utilizando-se uma solução de  $\text{La}^{3+}$ , cuja função é ajudar no processo de atomização, para então ser utilizada na determinação direta da porcentagem de alumínio. A curva analítica foi construída utilizando procedimento similar a parte de misturas mecânicas de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de massas conhecidas.

### **3.6- Caracterização físico-química dos suportes cromatográficos**

#### **3.6.1- Determinação da área superficial ( $S_{\text{BET}}$ ), volume ( $v_p$ ) e diâmetro médio dos poros ( $d_p$ )**

Determinou-se a área superficial específica ( $S_{BET}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) da sílica aluminizada dos lotes YMC-Al-3, K-Al e K-2Al, a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K obtidas no analisador ASAP.

### **3.6.2- Teste de estabilidade da sílica aluminizada em soluções ácidas e básicas**

Preparou-se soluções aquosas com pH nominal igual a 2,0; 1,0 e 0,0 utilizando-se ácido nítrico, o qual foi escolhido por possuir a característica de não complexar com átomos de alumínio, e soluções aquosas com pH 12,0; 11,0 e 10,0 à partir de uma solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio, utilizando-se o pHmetro.

Em cada um de dois tubos de 150 mL com tampa foi adicionada uma alíquota de 125,0 mL da solução de pH 12,0. À um dos tubos adicionou-se 0,500 g de sílica aluminizada YMC-Al-1 e no outro tubo, a mesma quantidade de sílica aluminizada YMC-Al-2. Os tubos foram fixados no agitador roto-torque e submetidos à agitação em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Após 1h, 2h, 4h, 6h e 24h de agitação foram retiradas alíquotas de 25 mL de cada um dos tubos, as quais foram submetidas à centrifugação para eliminar a parte sólida e reservou-se o líquido sobrenadante em frascos de vidro para posterior determinação da quantidade de alumínio presente em cada alíquota. Este mesmo procedimento foi repetido utilizando-se cada uma das soluções preparadas com diferentes pH.

A concentração de alumínio presente nas amostras coletadas foi determinada pelo professor José Salvador Barone no laboratório de análises Puriquima Ltda., permitindo assim se avaliar a estabilidade da sílica aluminizada submetida a pH extremo através da quantidade de alumínio desprendida durante os vários períodos de agitação.

### **3.6.3 - Microscopia de Varredura Eletrônica (SEM)**

Uma amostra de sílica YMC-Gel nua foi submetida a SEM para que se pudesse observar a forma e a distribuição do tamanho das partículas. O preparo da amostra consistiu em recobri-la com uma camada de ouro (10 nm), que foi bombardeada com átomos de argônio sob alto vácuo.

## **3.7- Preparo das fases estacionárias**

### **3.7.1- Sorção da fase líquida**

Diferentes lotes de fase estacionária foram preparados a partir de uma massa inicial específica ( $m_{\text{PMOS}}^i$ ) de aproximadamente  $1 \text{ g}_{\text{PMOS}}/\text{g}_{\text{SiAl}}$  pela adição de determinada massa de sílica aluminizada (seca à  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h) a uma solução de PMOS em diclorometano. Esta mistura foi agitada lentamente por 3 h à temperatura ambiente e em seguida o diclorometano foi evaporado à temperatura ambiente.

As FR sorvidas foram preparadas utilizando-se como suporte a sílica aluminizada YMC-Al-3, K-Al e K-2Al. Foi obtida também uma FE sorvida utilizando-se este mesmo procedimento, porém com uma massa inicial específica de  $1,2 \text{ g}_{\text{PMOS}} / 1,0 \text{ g}_{\text{SiAl}}$  sobre o suporte K-2Al.

### **3.7.2- Imobilização das fases estacionárias por tratamento térmico**

Alíquotas com cerca de 1 g de fase sorvida preparadas a partir do lote YMC-Al-3 foram submetidas à tratamento térmico 6 dias após o preparo da fase sorvida [15]. Estas porções de fase estacionária sorvida foram colocadas individualmente em tubos de aço inoxidável (150 mm x 10 mm) e postas no interior do forno tubular. Manteve-se

um fluxo contínuo de nitrogênio através da fase estacionária durante seu tratamento térmico no interior do forno.

Variou-se o tempo (8 h e 16 h) e a temperatura (100 °C, 120 °C e 140 °C) de imobilização térmica, para avaliar a influencia destes fatores no desempenho cromatográfico das FE resultantes. Os tempos e temperaturas de aquecimento foram estabelecidos com base nos resultados obtidos nos trabalhos realizados por Bottoli e colaboradores [11].

Uma FE à base de sílica aluminizada YMC-Al-3 foi obtida por imobilização térmica à 120 °C por 8 h, 14 dias após o preparo da fase sorvida, para avaliar a influencia do tempo de auto-imobilização [12] no desempenho cromatográfico desta FE.

Um estudo posterior foi feito imobilizando-se termicamente à 120 °C por 8 h as fases sorvidas sobre K-Al e K-2Al com  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,0$  e  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,2$ , seis dias após o preparo destas fases sorvidas .

Foi obtida também uma FE imobilizada termicamente seis dias após o preparo da fase sorvida sobre K-2Al com  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,0$  utilizando-se a técnica de pulso de temperatura. Esta técnica consiste em manter a fase sorvida em uma temperatura menor que aquela utilizada para imobilização do polímero durante um certo período de tempo, com o intuito de promover a "acomodação" das cadeias poliméricas no interior dos poros da sílica antes da imobilização. Neste trabalho manteve-se a fase sorvida à 90 °C por 24 h, submetendo-a, logo em seguida, à temperatura de 120 °C por mais 8 h.

### **3.7.3- Extração do excesso de polímero**

Após cada imobilização realizada, o tubo de aço inoxidável contendo a FE foi colocado no interior de um forno à 50°C e conectado à uma bomba cromatográfica para extração do PMOS não imobilizado através da passagem de hexano no interior do tubo por 3 h à vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Este procedimento de extração foi estabelecido com base nos resultados apresentados por um trabalho realizado anteriormente no LabCrom [12].

## **3.8- Caracterização físico-química das fases estacionárias**

### **3.8.1- Espectroscopia no Infravermelho**

Obteve-se espectros de absorção no infravermelho a partir de amostras de sílica YMC-Gel, sílica aluminizada do lote YMC-Al-3 e da fase imobilizada termicamente por 8 h à 120 °C em sílica aluminizada YMC-Al-3 sob a forma de pastilhas em brometo de potássio, no intervalo espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Através da presença de bandas características, avaliou-se qualitativamente a incorporação dos átomos de alumínio na sílica, do PMOS na sílica aluminizada e o grau de recobrimento dos grupos hidroxila da superfície do suporte pelo PMOS.

### **3.8.2- Determinação da área superficial, volume e tamanho de poros (ASAP)**

Determinou-se a área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) das fases estacionárias de PMOS imobilizado a 120 °C por 8 h sobre os suportes K-Al e K-2Al, a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K .

### **3.8.3- Análise elementar de carbono**

As FR obtidas a partir dos lotes YMC-Al-3, K-Al e K-2Al foram submetidas à análise elementar de carbono, que determina o teor total de carbono nas FE. A partir das porcentagens de carbono (%C), calculou-se a massa específica de PMOS ( $m_{\text{PMOS}}$ ), que representa a massa do polímero imobilizada em cada grama de sílica aluminizada, utilizando a equação X. Para a realização deste cálculo, considerou-se que 62% da massa do PMOS corresponde a massa de carbono [11].

$$m_{\text{PMOS}} = \%C / (62 - \%C) \quad (\text{X})$$

Sabendo-se a massa específica de PMOS imobilizado, pode-se calcular a espessura da camada polimérica ( $\tau$ ) no interior dos poros do suporte pela equação XI [11].

$$\tau = - [(d_p^2 - Fd_p^2)^{0.5} - d_p] / 2 \quad (\text{XI})$$

Para o cálculo de  $\tau$ , utilizou-se o valor de diâmetro médio dos poros do suporte ( $d_p$ ) obtido por ASAP e a fração F, que é calculada pela equação XII.

$$F = m_{\text{PMOS}} / m_{\text{poros cheios}} \quad (\text{XII})$$

A variável  $m_{\text{poros cheios}}$  corresponde a massa de polímero necessária para preencher os poros do suporte. O cálculo de  $m_{\text{poros cheios}}$  é feito utilizando-se o valor de volume específico de poros do suporte ( $v_p$ ) obtido por ASAP e a densidade do PMOS, que é de  $0,91 \text{ g mL}^{-1}$ , como descrito pela equação (XIII):

$$m_{\text{poros cheios}} = (v_p \times 0,91) \text{ g}_{\text{PMOS}} / \text{g}_{\text{SiAl}} \quad (\text{XIII})$$

### **3.8.4- Espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR)**

Espectros de NMR no estado sólido de  $^{29}\text{Si}$  para as sílicas puras YMC-Gel e Kromasil, e para a fase estacionária K-2Al(PMOS) foram obtidos utilizando-se a técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico (CP / MAS). Foi utilizado um tempo de contato de 5 ms e um intervalo de pulso de 1,5 s.

### **3.9- Polimento e confecção das colunas cromatográficas**

Colunas cromatográficas com 60 mm de comprimento por 3,9 mm de diâmetro interno foram confeccionadas à partir de tubos de aço inoxidável 316 na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP. A superfície interna destes tubos foi polida utilizando uma técnica desenvolvida no LabCrom [47], que consiste na passagem de uma haste de metal revestida com palha de aço e pasta de polimento,

acoplada a uma furadeira, no interior do tubos. Após o polimento, estes tubos foram lavados com ácido nítrico 50% v/v, água, detergente, acetona e metanol, com o objetivo de deixar a superfície livre de impurezas.

O polimento das colunas se faz necessário, pois colunas com a superfície interna bem polida contribuem para enchimentos mais eficientes e um melhor desempenho cromatográfico [47].

### **3.10- Enchimento das colunas com as fases estacionárias**

#### **3.10.1- Preparo da suspensão de fase estacionária para o enchimento**

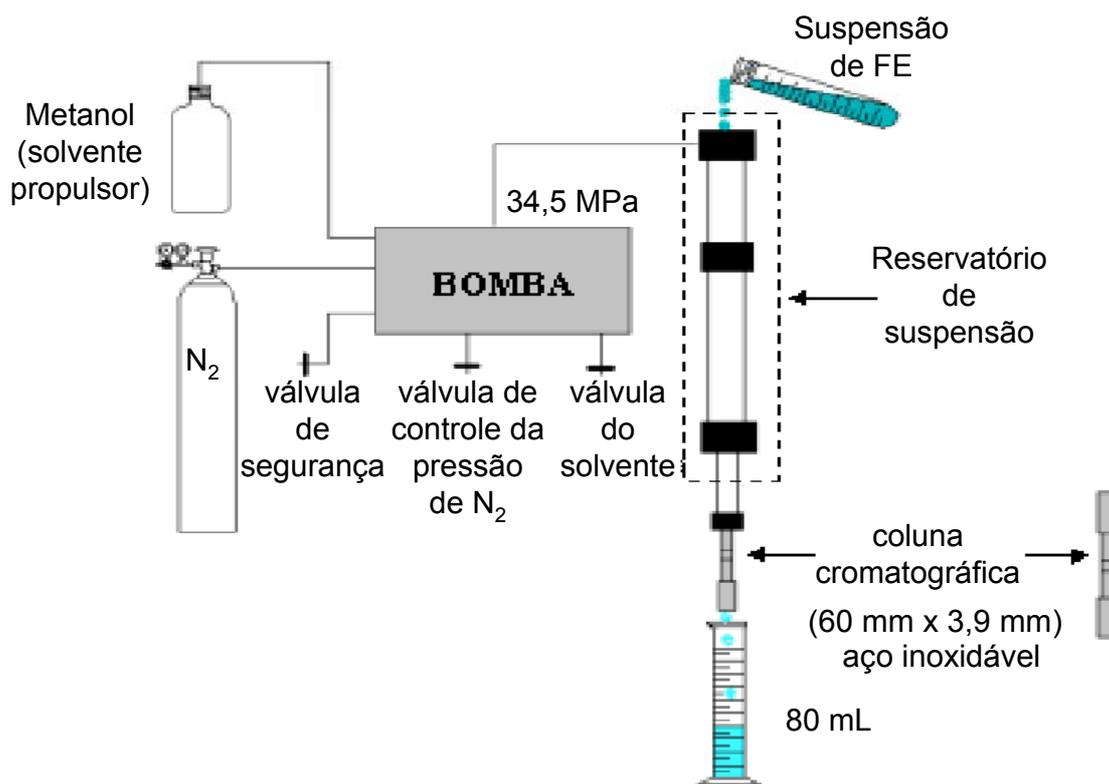
Uma suspensão de FE em clorofórmio na concentração de 10% (m/v) foi utilizada para o enchimento das colunas. Esta concentração de suspensão é apropriada para evitar a formação indesejada de aglomerados e a sedimentação das partículas durante o processo de enchimento, o que pode levar a formação de um recheio não uniforme [48]. Desta maneira, preparou-se a suspensão pesando-se em um tubo de ensaio com tampa uma massa de FE adequada ao volume da coluna e clorofórmio. A suspensão foi mantida sob agitação contínua no agitador roto-torque durante cerca de 14 h antes de se realizar o enchimento.

#### **3.10.2- Enchimento das colunas cromatográficas**

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando-se o sistema descrito na figura 6. O sistema de enchimento é constituído fundamentalmente de um cilindro de nitrogênio, uma bomba de enchimento Haskel, um reservatório de suspensão de 32 mL e a coluna cromatográfica a ser recheada.

O enchimento ocorre devido à passagem de um solvente propulsor (metanol), a alta pressão, que desloca as partículas de FE da suspensão presente no reservatório

para o interior da coluna cromatográfica. Uma pressão de 34,5 MPa (5000 psi) foi utilizada para impulsionar o metanol através do sistema para o enchimento das colunas. Duas a três colunas diferentes foram recheadas para cada FE preparada.



**Figura 6:** Descrição do sistema de enchimento de colunas cromatográficas.

### 3.10.3- Condicionamento das colunas

Após o enchimento da coluna, é necessário realizar seu condicionamento com a FM que será empregada na avaliação cromatográfica da coluna, para eliminar todos os vestígios dos solventes usados no enchimento e também para que a FE fique em equilíbrio com a FM. O condicionamento das colunas foi feito no próprio cromatógrafo onde será realizada a análise cromatográfica, mas sem que a saída da coluna esteja

conectada ao detector, pois os resíduos provenientes da coluna podem contaminar e até obstruir os capilares conectados à saída da coluna ou à cela do detector.

As colunas de CLAE-FR foram condicionadas com FM metanol-água 70:30 (v/v) e as colunas de CLAE-FN foram condicionadas com FM hexano/etanol 95:5 (v/v), em ambos os casos durante 3 h à vazão de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  [15] antes de serem avaliadas cromatograficamente.

### **3.11- Preparo da fase móvel**

Os solventes empregados na composição da FM foram filtrados em uma membrana de Nylon com  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade antes do preparo da FM, para evitar que impurezas presentes nos solventes provocassem o entupimento dos capilares no sistema cromatográfico, danificassem bombas ou afetassem o desempenho da coluna.

A FM também foi desgaseificada em ultra-som sob vácuo antes de ser utilizada, pois a presença de bolhas de ar pode prejudicar o processo cromatográfico, interferindo na vazão do solvente ou promovendo instabilidade na linha de base do sinal do detector quando se aloja na cela de detecção.

As FM preparadas para a realização deste trabalho foram: metanol-água 70:30 (v/v) utilizada para as análises em CLAE-FR, hexano/etanol 95:5 (v/v) empregada nas análises por CLAE-FN e metanol/tampão carbonato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  30:70 (v/v) com pH 9,0, utilizada no teste de estabilidade.

### **3.12- Avaliação cromatográfica**

Neste trabalho, foram utilizadas três diferentes misturas teste para realizar a avaliação cromatográfica das FE:

MISTURA 1: uracil, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno

MISTURA 2: fenol, naftaleno, N,N-dimetilanilina e acenafteno

MISTURA 3: benzeno, benzoato de etila, benzonitrila e álcool benzílico

Nenhum destes reagentes foi purificado antes de ser utilizado, exceto a N,N-dimetilanilina que foi purificada por destilação.

A mistura 1 foi utilizada com o objetivo de avaliar o comportamento da coluna na separação de compostos neutros com polaridades diferentes e a mistura 2, de compostos com caráter ácido (fenol), básico (N,N-dimetilanilina) e neutros (naftaleno e acenafteno). A mistura 3 foi empregada na avaliação de colunas em CLAE-FN. O uracil foi utilizado para medir o tempo de retenção de um composto não retido ( $t_M$ ) quando utilizadas as misturas 1 e 2, e o benzeno para a mistura 3.

Para a avaliação das colunas utilizou-se os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção ( $k$ ), eficiência ( $N\ m^{-1}$ ), altura reduzida ( $h$ ), resolução ( $R_s$ ) e assimetria ( $A_s$ ) à 10% (b/a). Estes parâmetros foram obtidos através do software *Report Write Plus* contido no sistema de aquisição de dados cromatográficos *Chrom Perfect (Justice Innovations)*.

As mesmas FM utilizadas no condicionamento das colunas após o enchimento foram utilizadas na análise cromatográfica e foram feitas de duas a três injeções das diferentes misturas em cada coluna recheada.

### **3.13- Avaliação da estabilidade de fases estacionárias**

Com o objetivo de verificar a estabilidade de FE preparadas neste trabalho, a coluna recheada com a fase K-2Al(PMOS) foi submetida a um estudo de estabilidade cujo procedimento foi desenvolvido no LabCrom [42]. O procedimento utilizado consistiu em submeter a FE à condições agressivas de FM, sendo ela composta de 50:50 v/v metanol / tampão carbonato  $0,1\ mol\ L^{-1}$ , pH 9, com vazão de  $0,6\ mL\ min^{-1}$ , em temperatura de  $60\ ^\circ C$ . Estas condições permitem que o teste seja realizado rapidamente (em um ou dois dias) reduzindo a quantidade de solventes utilizados e consequentemente, de resíduos gerados.

Para se avaliar a estabilidade da FE, após a passagem de FM em vazão de  $0,6\ mL\ min^{-1}$  durante 40 min através da coluna, condicionou-se a coluna utilizando-se a mesma FM em vazão de  $0,3\ mL\ min^{-1}$  durante 10 min. Injetou-se, em seguida, a

mistura 1 para se avaliar possíveis modificações ocorridas nos parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção para o composto mais retido da mistura 1, o naftaleno, em decorrência do contato da FE com a FM agressiva.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Otimização das condições de preparo da sílica aluminizada

Os três métodos de solubilização da sílica aluminizada levaram a resultados muito semelhantes de porcentagem de alumínio para uma mesma amostra. Desta maneira, devido a sua simplicidade, foi utilizado o método de digestão da sílica aluminizada em ácido clorídrico e ácido nítrico (3:1 v/v) com determinação da porcentagem de alumínio diretamente no sobrenadante por FAAS para todas as amostras de sílica aluminizada.

A tabela 2 mostra os resultados do processo de aluminização da sílica Rainin em função da temperatura, fixado o tempo de 8 horas.

**Tabela 2:** Porcentagens em massa de alumínio obtidas nas amostras de sílica Rainin aluminizadas em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	% Al	$\mu\text{mol Al} / \text{m}^2$ de sílica	Al / silanol *
20	3,48	6,86	0,86
40	3,17	6,19	0,77
60	3,74	7,34	0,92
80	3,97	7,86	0,98

\*  $(\mu\text{mol Al} / \text{m}^2) / (\mu\text{mol silanol} / \text{m}^2)$

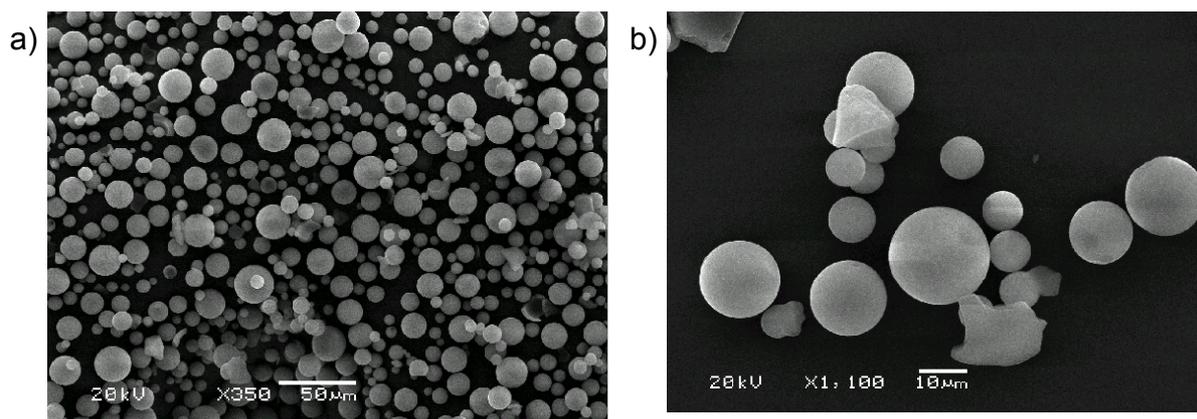
Considerando-se a área superficial da sílica Rainin (tabela 1), a quantidade teórica de alumínio necessária para reagir com o máximo número de silanóis

disponíveis na superfície é de 4,0 %. Portanto, o resultado que mais se aproxima deste valor foi obtido quando a aluminização foi realizada na temperatura de 80 °C. Supondo a formação de uma monocamada de alumínio na superfície da sílica, os valores de Al / silanol sugerem que cada átomo de alumínio encontra-se ligado a um grupo silanol.

## 4.2- Caracterização físico-química da sílica YMC-Gel

A sílica Kromasil foi utilizada como suporte cromatográfico em outros trabalhos realizados no LabCrom [9,41,50], já a sílica YMC-Gel foi empregada como suporte pela primeira vez neste trabalho. Para conhecer melhor as características morfológicas da sílica YMC-Gel, uma amostra desta sílica foi submetida a Microscopia de Varredura Eletrônica e obteve-se as imagens presentes na figura 7.

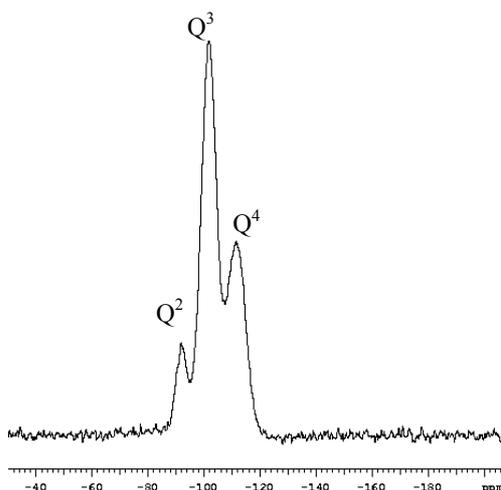
Observando-se a figura 7, é possível verificar que o diâmetro das partículas de sílica YMC-Gel não é uniforme e, também, que existem partículas com formato não esférico que podem se tratar de partículas quebradas. Esta não uniformidade das partículas pode afetar o desempenho das colunas cromatográficas, uma vez que a obtenção de uma boa coluna está baseada em seu recheio, o qual deve ser composto por partículas com a faixa mais estreita possível de distribuição [49].



**Figura 7:** Microscopia de Varredura Eletrônica da sílica YMC-Gel com aumento de a) 350 vezes e b) 1100 vezes

Obteve-se o espectro de  $^{29}\text{Si}$  (CP/MAS) NMR da sílica YMC-Gel nua, descrito na figura 8, para observar a distribuição e tipos de grupos silanóis presentes em sua superfície.

Os sinais exibidos no espectro da figura 8 são referentes ao grupo siloxano ( $\text{Q}^4$ ) em -111 ppm, aos silanóis livres e associados ( $\text{Q}^3$ ) em -102 ppm e aos silanóis geminais ( $\text{Q}^2$ ) em -92 ppm [50,51]. Estes picos são característicos das sílicas utilizadas como suportes cromatográficos em CLAE que, em geral, apresentam uma maior quantidade de grupos silanóis isolados, o que resulta no caráter ácido apresentado pela superfície da sílica. Este caráter ácido é responsável pela indesejável interação do suporte das FE à base de sílica com os compostos básicos do analito.



**Figura 8:** Espectro de  $^{29}\text{Si}$  (CP/MAS) NMR da sílica YMC-Gel nua.

### **4.3- Caracterizações físico-químicas dos suportes cromatográficos de sílica YMC-Gel e Kromasil aluminizadas**

Na tabela 3 encontram-se os valores de porcentagem de alumínio nas sílicas YMC-Gel e Kromasil aluminizadas obtidos por FAAS.

**Tabela 3:** Porcentagens em massa de alumínio e número de átomos de alumínio por silanol do suporte nos diferentes lotes de sílica YMC-Gel e Kromasil aluminizadas.

<b>Sílica aluminizada</b>	<b>% Al</b>	<b><math>\mu\text{mol Al} / \text{m}^2</math> de sílica</b>	<b>Al / silanol*</b>
YMC-AI-1	7,1	8,58	1,07
YMC-AI-2	7,7	9,35	1,17
YMC-AI-3	7,2	8,71	1,08
K-AI	4,2	4,74	0,59
K-2Al	8,9	10,5	1,31

\*  $(\mu\text{mol Al} / \text{m}^2) / (\mu\text{mol silanol} / \text{m}^2)$

Considerando-se a área superficial da sílica YMC-Gel, a quantidade teórica de alumínio necessária para reagir com o máximo número de silanóis disponíveis na superfície é de 7,0 %. Supondo a formação de uma monocamada de alumínio na superfície da sílica YMC-Gel, os valores de Al / silanol sugerem que cada átomo de alumínio encontra-se ligado a um grupo silanol.

Para a sílica Kromasil, a quantidade teórica de alumínio necessária para reagir com o máximo número de silanóis presentes em sua superfície é de 6,8 %. Desta maneira, considerando-se que cada silanol da superfície da sílica Kromasil reaja com um átomo de alumínio para a formação de uma monocamada, de maneira semelhante ao que foi observado para as sílicas Rainin e YMC-Gel, têm-se que em K-AI (preparada por uma reação de aluminização) não se obteve uma monocamada completa. A não obtenção de uma monocamada de alumínio completa em K-AI pode ter sido resultado da estrutura de poros apresentada pela sílica Kromasil, uma vez que o formato dos poros pode dificultar o acesso da solução de reagente aos silanóis presentes no interior das partículas.

Em K-2Al a porcentagem de alumínio para obtenção de uma monocamada foi atingida. Porém, tendo em vista o que foi observado em K-AI, provavelmente antes da formação de uma monocamada completa pode ter havido o início da formação de uma segunda camada de alumínio, de maneira que os silanóis mais internos aos poros tenham permanecido sem se ligar a átomos de alumínio.

Na tabela 4 estão descritos os valores de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) obtidos para YMC-AI-3, K-AI e K-2AI pela técnica de ASAP e também os dados dos mesmos parâmetros para a sílica YMC-Gel e Kromasil antes de serem submetidas ao processo de aluminização.

Houve uma pequena redução no valor de  $S_{BET}$  para YMC-AI-3 com relação à sílica YMC-Gel nua, como consequência da pequena redução ocorrida nos valores de  $v_p$  e  $d_p$ . Esta alteração observada nos valores de  $S_{BET}$ ,  $v_p$  e  $d_p$  pode ser considerada um indicativo da formação de uma camada de alumínio sobre a superfície da sílica YMC-Gel após a reação de aluminização.

**Tabela 4:** Valores obtidos por ASAP de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) para YMC-AI-3, K-AI e K-2AI. Dados de  $S_{BET}$ ,  $d_p$  e  $v_p$  fornecidos pelo fabricante para as sílicas Kromasil e YMC-Gel.

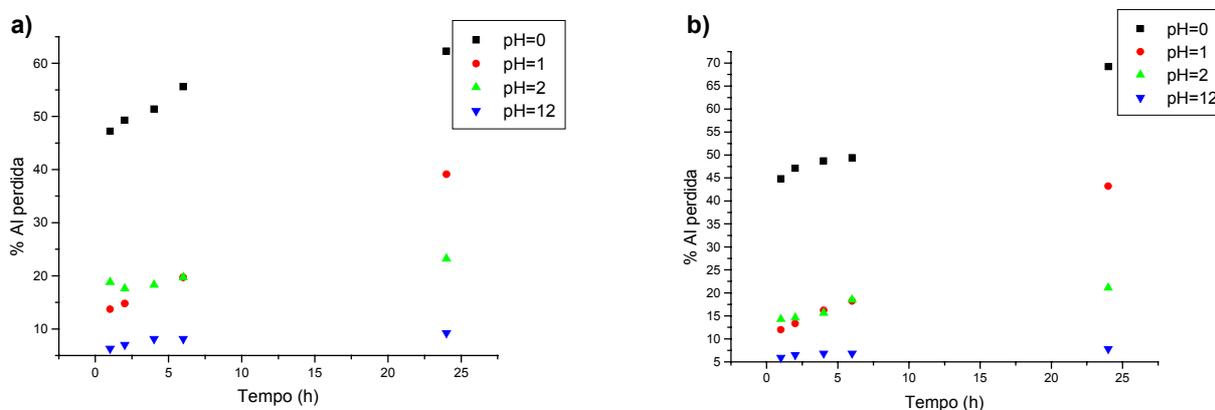
	$S_{BET}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$v_p$ ( $mL g^{-1}$ )	$d_p$ (nm)
<b>YMC-Gel</b>	344	1,02	12,0
<b>YMC-AI-3</b>	328	0,91	11,1
<b>Kromasil</b>	330	0,89	11,3
<b>K-AI</b>	322	0,89	11,1
<b>K-2AI</b>	298	0,87	11,1

Para K-AI e K-2AI pode ser observada uma progressiva redução nos valores de  $S_{BET}$  com relação à sílica Kromasil nua. Porém não houve alteração nos valores de  $v_p$  e  $d_p$ . De acordo com os dados da tabela 4, o comportamento da sílica Kromasil com relação ao processo de aluminização vêm mais uma vez mostrar que é possível que a estrutura dos poros da sílica Kromasil dificultem a penetração da solução de reagente no interior das partículas. Desta maneira, os silanóis presentes no interior dos poros não reagem efetivamente com o isopropóxido de alumínio, não havendo, portanto, alteração dos valores de  $v_p$  e  $d_p$ .

## 4.4- Testes de estabilidade da sílica aluminizada em soluções ácidas e básicas

A partir da concentração de alumínio presente no sobrenadante em  $\text{mg L}^{-1}$  obtida por Espectroscopia de Absorção Atômica com chama, foi possível calcular a porcentagem de alumínio perdida pela sílica aluminizada dos lotes YMC-AI-1 e YMC-AI-2 submetida às diferentes condições de pH. Na figura 9 há a representação gráfica da perda de alumínio, expressa em % Al perdida em função do tempo, para cada um dos diferentes pH utilizados no teste.

Comparando-se as figuras 9a e 9b é possível verificar que os lotes YMC-AI-1 e YMC-AI-2, que possuem porcentagens iniciais de alumínio muito próximas (tabela 3), comportaram-se de maneira semelhante quando submetidos às mesmas condições de pH.



**Figura 9:** Porcentagem de alumínio perdida pela sílica aluminizada dos lotes YMC-AI-1 (a) e YMC-AI-2 (b) em função do tempo, nas diferentes condições de pH à que foram submetidos.

Não foi detectada perda de alumínio nos pH 10 e 11, pois os valores de % Al foram menores que o limite de detecção, podendo-se apenas afirmar que a perda foi menor que  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Em pH = 12, a perda após 24 h de agitação não ultrapassou 10%

da quantidade de alumínio inicialmente presente, tanto em YMC-AI-1 quanto em YMC-AI-2. Já em meio ácido observa-se que a quantidade de alumínio perdida aumenta com a diminuição do pH, sendo que a perda de alumínio após 24 h de agitação em pH = 2 foi cerca de 22%, atingindo cerca de 66% (em média para YMC-AI-1 e YMC-AI-2) após o mesmo tempo de agitação em pH = 0.

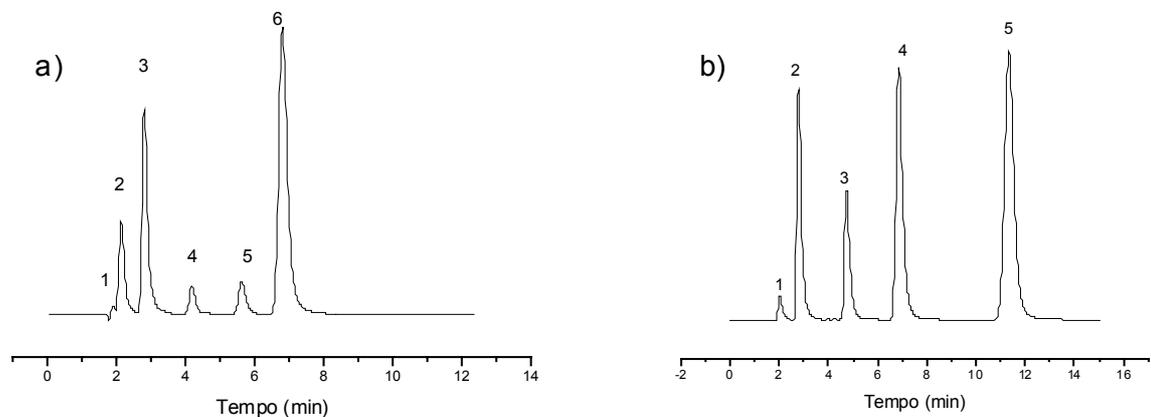
Estes resultados mostram que a sílica aluminizada apresenta uma boa estabilidade quando submetida a pH elevados, o que não se repete em pH baixos, uma vez que a quantidade de alumínio perdida em meio ácido é considerável após longos tempos de agitação.

#### **4.5- Avaliações cromatográficas das fases estacionárias comerciais**

Recheou-se uma coluna com FE comercial C-8 a base de sílica Kromasil 5  $\mu$ m com o objetivo de utilizar os parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação desta fase comercial à base de sílica como referência para avaliação das FE a base de sílica aluminizada. A coluna desta FE comercial foi obtida utilizando-se o mesmo método de enchimento, condicionamento e avaliação cromatográfica a que foram submetidas as FE obtidas neste trabalho. Desta maneira, por meio da comparação entre a FE comercial e as FE preparadas neste trabalho, buscou-se eliminar a interferência dos métodos e equipamentos empregados, na avaliação dos parâmetros cromatográficos.

Os cromatogramas obtidos utilizando-se a coluna recheada com FE comercial estão descritos na figura 10 e os parâmetros cromatográficos correspondentes encontram-se nas tabelas 5 e 6.

Os valores de k das tabelas 5 e 6 foram calculados a partir da injeção de uracil em separado da mistura teste utilizada.



**Figura 10:** Cromatogramas obtidos utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: comercial Kromasil C-8 5  $\mu\text{m}$ ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: a) 1- uracil, 2- acetona, 3- benzonitrila, 4- benzeno, 5-tolueno, 6- naftaleno b) 1- uracil, 2- fenol, 3- N,N-dimetilanilina, 4- naftaleno, 5- acenafteno.

**Tabela 5:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 10a para a fase C-8 comercial a base de sílica Kromasil.

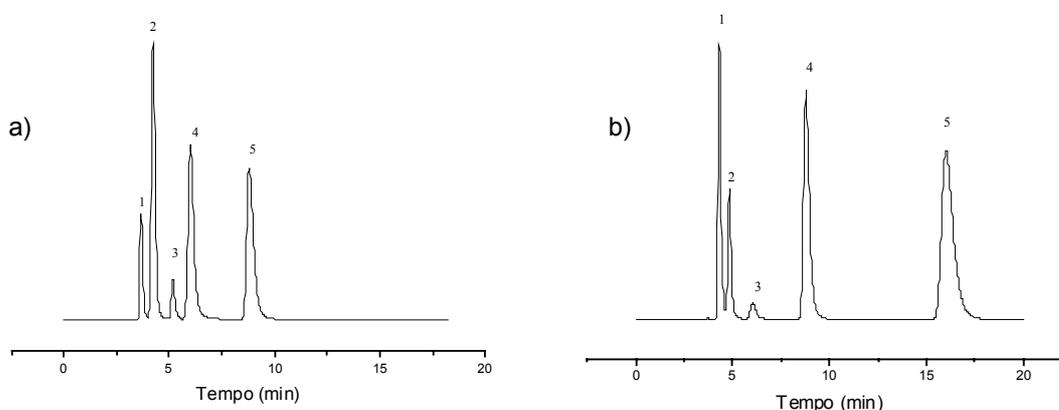
	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Acetona	14000	1,4	0,9	0,1	14,3
3- Benzonitrila	23900	1,7	2,3	0,5	8,4
4- Benzeno	41800	1,3	4,4	1,2	4,8
5- Tolueno	53700	1,3	2,7	2,0	3,7
6- Naftaleno	59400	1,3	2,8	2,6	3,4

**Tabela 6:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 7b para a fase C-8 comercial a base de sílica Kromasil.

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Fenol	18800	2,3	2,3	0,4	10,6
3- N,N-dimetilanilina	38500	2,1	1,3	1,4	5,2
4- Naftaleno	53600	1,6	2,3	2,4	3,7
5- Acenafteno	67800	1,4	2,1	4,6	2,9

Foi realizada também a análise cromatográfica de uma coluna comercial recheada com FE tendo como suporte partículas de alumina com 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (LiChroCART 250-4 Aluspher 100 RP-select B 5  $\mu\text{m}$ ). Esta coluna foi avaliada com o intuito de comparar seu desempenho cromatográfico com o desempenho apresentado pelas FE à base de sílica aluminizada preparadas neste trabalho.

Os cromatogramas obtidos utilizando-se a coluna comercial com FE à base de alumina estão descritos na figura 11, e os parâmetros cromatográficos correspondentes estão nas tabelas 7 e 8.



**Figura 11:** Cromatogramas obtidos utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: comercial à base de alumina 5  $\mu\text{m}$ ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: a) 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno b) 1- uracil, 2- fenol, 3- N,N-dimetilanilina, 4- naftaleno, 5- acenafteno.

**Tabela 7:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 11a para a fase comercial a base de alumina 5  $\mu\text{m}$ .

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Benzonitrila	10800	1,3	1,9	0,2	18,5
3- Benzeno	16100	1,4	2,9	0,4	12,4
4- Tolueno	10600	1,3	2,1	0,7	18,9
5- Naftaleno	13800	1,5	5,2	1,4	14,5

**Tabela 8:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 11b para a fase comercial a base de alumina 5  $\mu\text{m}$ .

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Fenol	17900	1,9	1,9	0,2	11,1
3- Naftaleno	8200	1,3	2,9	0,4	24,4
4- N,N-dimetilanilina	16800	1,8	1,8	0,7	11,9
5- Acenafteno	13200	2,0	1,7	1,4	15,1

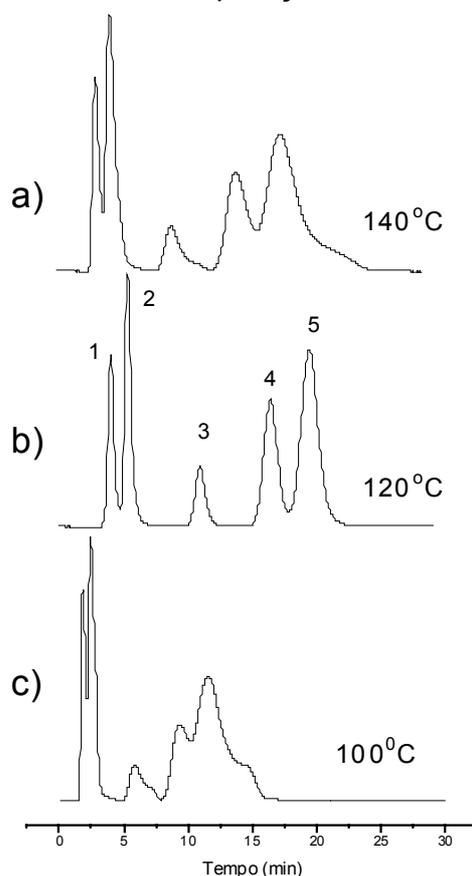
## **4.6- Avaliações físico-químicas e cromatográficas das fases estacionárias de PMOS imobilizado termicamente sobre o suporte YMC-AI-3**

### **4.6.1- Fases estacionárias de PMOS imobilizadas termicamente sobre YMC-AI-3 6 dias após o preparo da fase sorvida**

A figura 12 mostra os cromatogramas obtidos para as fases imobilizadas em diferentes temperaturas durante 8 h. Os parâmetros cromatográficos obtidos a partir do

cromatograma da figura 12b, encontram-se na tabela 9. Os valores de k da tabela 9 foram calculados a partir da injeção de uracil em separado da mistura teste utilizada. Para os demais cromatogramas da figura 12 não foi possível obter os parâmetros cromatográficos.

Comparando-se os cromatogramas da figura 12 é possível observar que na temperatura de imobilização de 120 °C obteve-se a fase que gerou uma melhor separação entre os componentes da mistura 1. Os valores de h apresentados por esta FE são muito próximos dos valores apresentados pela FE comercial à base de sílica Kromasil, indicando que a coluna de FE à base de sílica aluminizada com PMOS imobilizado à 120 °C durante 8 h realiza separações com boa eficiência.



**Figura 12:** Cromatogramas correspondentes as fases de PMOS imobilizadas por 8 h à 140°C (a), 120°C (b) e 100°C (c) sobre YMC-Al-3. Condições cromatográficas: Coluna de 60 x 3,9 mm; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno.

**Tabela 9:** Parâmetros cromatográficos obtidos para a fase YMC-Al-3(PMOS) obtida por imobilização à 120 °C por 8 h (figura 12b).

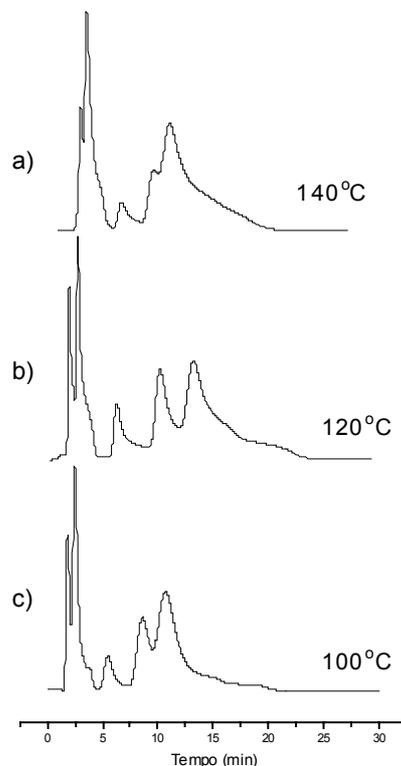
	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Benzonitrila	9100	1,2	1,4	0,5	7,8
3- Benzeno	15300	1,1	5,2	2,3	4,3
4- Tolueno	16700	1,1	3,1	3,9	3,9
5- Naftaleno	15100	1,0	1,3	4,8	4,3

Os valores de assimetria para YMC-Al-3(PMOS) estão mais próximos do ideal (1,0) [46] que aqueles obtidos utilizando-se a coluna recheada com a FE C-8 comercial e a coluna contendo fase à base de alumina, mesmo para compostos hidrofóbicos como o tolueno e o naftaleno. Este comportamento indica que a camada polimérica formada sobre a sílica aluminizada foi suficiente para recobri-la, impedindo a interação dos grupos polares presentes na superfície do suporte (silanóis  $\equiv\text{Si}-\text{OH}$  e aluminóis  $=\text{Al}-\text{OH}$ ) com os compostos que compõem a mistura analisada.

Foram obtidos valores mais elevados de resolução para YMC-Al-3(PMOS) em comparação à FE C-8 comercial, ou seja, foi possível obter uma melhor separação entre os compostos utilizando-se a fase à base de sílica aluminizada.

Na figura 13 são mostrados os cromatogramas obtidos utilizando-se as FE imobilizadas termicamente por 16 h nas temperaturas de 100 °C, 120 °C e 140 °C.

Os cromatogramas da figura 13 indicam que as FE obtidas após 16 h de imobilização térmica não apresentam um bom desempenho cromatográfico, pois é observado que houve uma separação não efetiva entre os compostos e a obtenção de picos pouco simétricos. Desta maneira não foi possível obter os parâmetros cromatográficos a partir destes cromatogramas.



**Figura 13:** Cromatogramas correspondentes as fases de PMOS imobilizadas por 16 h à 140°C (a), 120°C (b) e 100°C (c) sobre YMC-Al-3. Condições cromatográficas: Coluna de 60 x 3,9 mm; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno.

Para uma melhor compreensão do comportamento das FE obtidas nos diferentes tempos e temperaturas de imobilização térmica, cada uma delas foi submetida a análise elementar de carbono. Os resultados da análise elementar de carbono foram utilizados para se calcular os valores de  $m_{\text{PMOS}}$  (massa específica de PMOS) e  $\tau$  (espessura da camada de PMOS formada sobre a superfície do suporte) à partir das equações X, XI, XII e XIII.

Os valores de  $m_{\text{PMOS}}$  e  $\tau$  calculados para as fases YMC-Al-3(PMOS) obtidas nas diferentes temperaturas e tempos de imobilização térmica encontram-se na tabela 10.

**Tabela 10:** Valores de massa específica de PMOS e espessura da camada polimérica formada após a imobilização térmica do PMOS sobre a sílica aluminizada (YMC-Al-3) por 8 h e 16 h, seguida de sua extração com hexano.

Temperatura (°C)	massa específica (g <sub>PMOS</sub> /g <sub>YMC-3</sub> )		espessura da camada ( $\tau$ ) (nm)	
	8 h	16 h	8 h	16 h
100	0,56	0,51	1,9	1,7
120	0,54	0,45	1,8	1,4
140	0,59	0,51	2,0	1,7

Comparando-se os valores de  $m_{\text{PMOS}}$  e  $\tau$  obtidos para as FE imobilizadas por 8 h e 16 h em cada uma das temperaturas estudadas, verifica-se a diferença entre eles é pequena. Ou seja, os comportamentos cromatográficos distintos apresentados pelas FE avaliadas não foram ocasionados pela quantidade de polímero presente sobre o suporte.

Era esperado que aplicando-se um maior tempo de imobilização térmica às fases sorvidas a configuração da camada polimérica obtida sobre as partículas do suporte seria mais uniforme e a obtenção de um recobrimento uniforme das partículas resultaria em um melhor desempenho cromatográfico, pois reduziria as interações indesejáveis entre o analito e o suporte. Porém isto não foi observado. Desta maneira, à partir dos resultados mostrados na tabela 10 e as figuras 12 e 13, é possível verificar que no caso das FE à base de sílica aluminizada YMC-Al-3, um maior tempo de imobilização térmica não interfere na quantidade de PMOS imobilizado, mas pode estar gerando uma distribuição das cadeias poliméricas sobre as partículas do suporte que não é favorável ao bom desempenho cromatográfico.

Para observar as alterações ocorridas na estrutura da sílica YMC-Gel após sua aluminização e após a imobilização térmica do PMOS, obteve-se os espectros de infravermelho presentes na figura 14, cujas bandas correspondentes estão descritas na tabela 11.

Os espectros da sílica YMC-Gel (figura 13a) e da sílica YMC-Gel aluminizada (figura 13b) apresentam praticamente as mesmas bandas, com intensidades

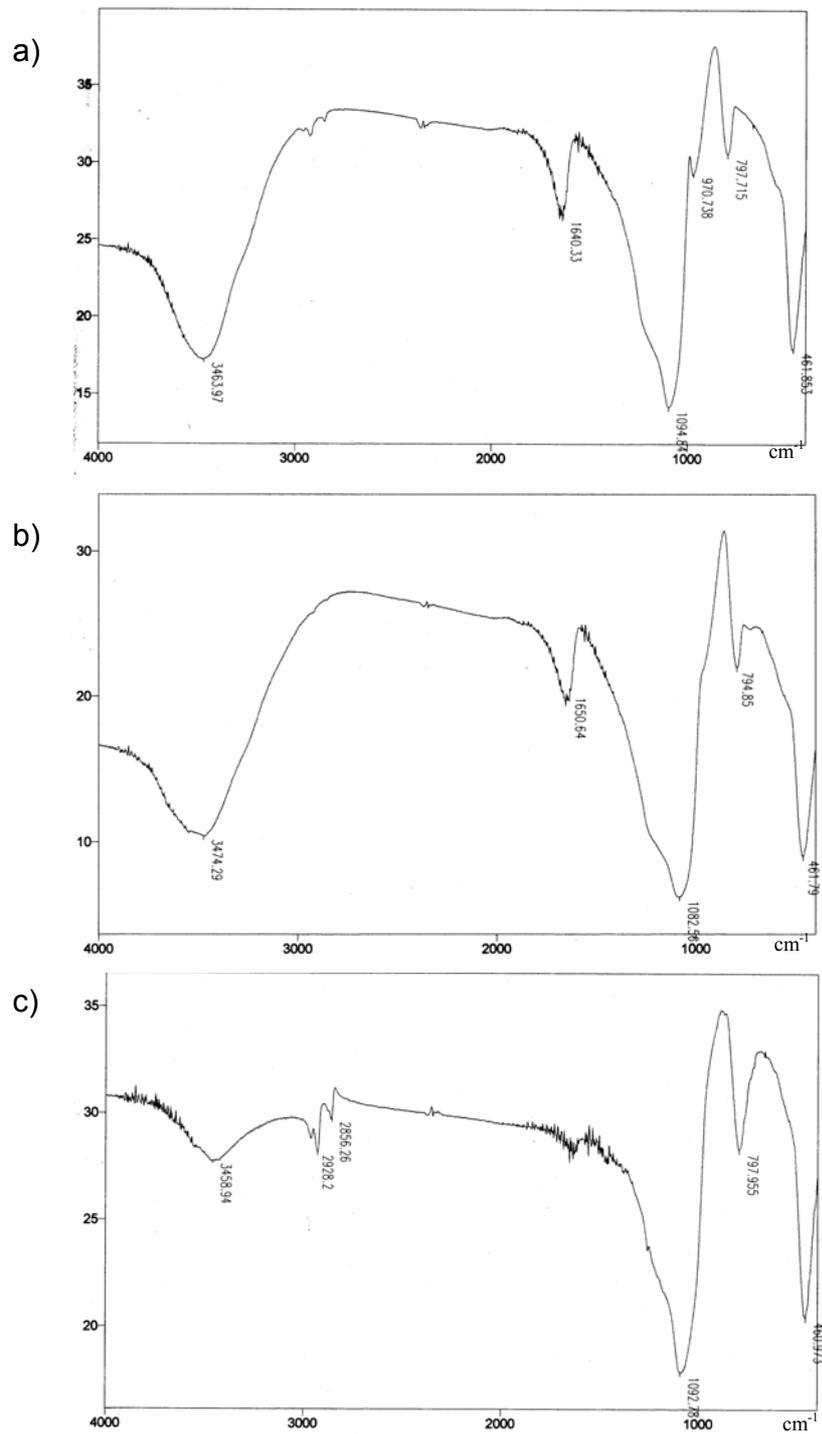
semelhantes. A única diferença observada entre eles é que, no espectro da sílica aluminizada, a banda correspondente ao Si-OH em  $971\text{ cm}^{-1}$  praticamente desapareceu, indicando ter ocorrido a reação destes grupos com o isopropóxido de alumínio.

No espectro da fase de PMOS imobilizado sobre a sílica aluminizada (figura 13c) a banda de  $3459\text{ cm}^{-1}$  sofreu uma redução considerável em sua intensidade. Esta banda corresponde à água adsorvida na superfície do suporte e aos grupos hidroxila da superfície do mesmo, e a redução em sua intensidade mostra que a camada polimérica formada recobriu de maneira satisfatória a superfície do suporte, gerando um caráter hidrofóbico. A ausência de água adsorvida na superfície do suporte após a formação da camada polimérica é confirmada pelo desaparecimento da banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao grupo -OH da água.

No espectro da figura 13c aparecem também bandas referentes aos grupos -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub>, indicando a presença do PMOS sobre o suporte de sílica aluminizada.

**Tabela 11:** Atribuições [52] às bandas dos espectros de infravermelho da sílica YMC-Gel, da sílica aluminizada YMC-Al-3 e da fase termicamente imobilizada à 120°C por 8 h YMC-Al-3(PMOS).

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )			Atribuição
YMC-Gel	YMC-Al-3	YMC-Al-3(PMOS)	
3464	3474	3459	$\nu$ OH dos silanóis da água adsorvida
-----	-----	3000	$\nu_{\text{as}}$ da ligação C-H do grupo -CH <sub>3</sub>
-----	-----	2928	$\nu_{\text{s}}$ da ligação C-H do grupo -CH <sub>2</sub>
-----	-----	2856	$\nu_{\text{as}}$ da ligação C-H do grupo -CH <sub>2</sub>
1640	1651	-----	$\delta$ OH da água
1095	1083	1093	$\nu_{\text{as}}$ Si-O-Si
971	-----	-----	$\nu$ Si-OH
798	795	798	$\nu_{\text{s}}$ Si-O-Si
462	462	461	$\delta$ Si-O-Si

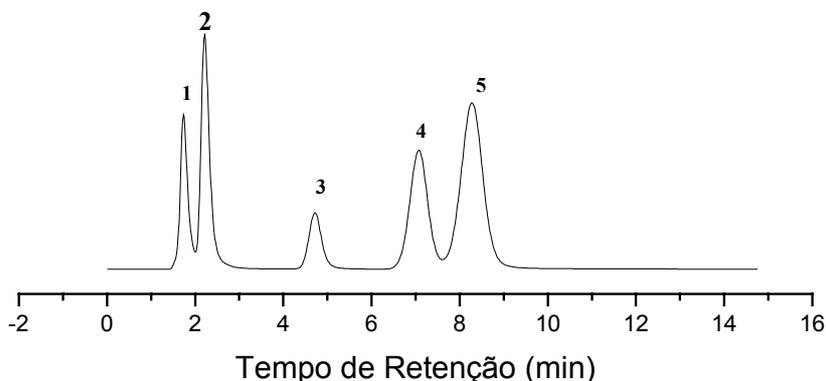


**Figura 14:** Espectros de infravermelho da sílica YMC-Gel (a), sílica aluminizada YMC-AI-3 (b) e fase de PMOS imobilizado à 120°C por 8 h sobre a sílica aluminizada YMC-AI-3(PMOS) (c).

#### 4.6.2- Fase estacionária de PMOS imobilizado termicamente sobre YMC-AI-3 14 dias após o preparo da fase sorvida

Segundo Bottoli e colaboradores, o bom desempenho cromatográfico das FE está diretamente relacionado ao tempo de sorção do polímero sobre as partículas do suporte (auto-imobilização), pois um maior tempo de auto-imobilização leva a uma distribuição mais uniforme do polímero sobre o suporte [33,50]. Desta forma, buscou-se obter uma FE com melhor desempenho cromatográfico, submetendo-a a imobilização térmica à 120 °C por 8 h 14 dias após o preparo da fase sorvida.

Na figura 15 está o cromatograma obtido utilizando-se esta FE e na tabela 12, os parâmetros cromatográficos referentes ao cromatograma.



**Figura 15:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: PMOS imobilizado termicamente à 120 °C por 8 h 14 dias após o preparo da fase sorvida sobre YMC-AI-3 ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4-tolueno, 5- naftaleno.

**Tabela 12:** Parâmetros cromatográficos obtidos para a fase YMC-AI-3(PMOS) obtida por imobilização a 120 °C por 8 h, 14 dias após o preparo da fase sorvida (figura 15).

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Benzonitrila	10800	1,2	1,5	0,3	6,1
3- Benzeno	19600	1,1	5,4	1,8	3,3
4- Tolueno	21300	1,0	3,5	3,1	3,1
5- Naftaleno	19600	1,0	1,5	3,9	3,3

Os dados da tabela 12 mostram que a fase imobilizada termicamente 14 dias após o preparo da fase sorvida apresenta valores de eficiência um pouco maiores que a fase imobilizada termicamente sob as mesmas condições 6 dias após o preparo da fase sorvida (tabela 9). Observa-se também uma pequena melhora na assimetria e resolução.

Porém, 14 dias de intervalo trata-se de um tempo relativamente grande se considerarmos que é mais que o dobro do intervalo de tempo utilizado anteriormente para obtenção das FE, e mesmo assim não gerou uma melhoria significativa nos parâmetros cromatográficos.

#### **4.7- Avaliações físico-químicas e cromatográficas das fases estacionárias a base de sílica Kromasil aluminizada**

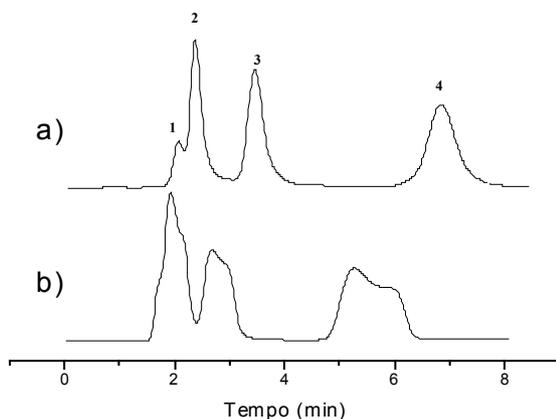
Foram obtidas FE imobilizadas termicamente utilizando-se sílica Kromasil aluminizada como suporte, pois esta sílica apresenta partículas esféricas com diâmetro médio de 5  $\mu\text{m}$  e uma distribuição uniforme de tamanho de partícula. Para aplicações em CLAE, micropartículas porosas esféricas com diâmetro médio de 5 ou 10  $\mu\text{m}$  são preferidas nas modernas tecnologias de coluna, porque formam leitos cromatográficos mais homogêneos e estáveis [17].

### 4.7.1- Avaliações cromatográficas em fase normal das fases à base de sílica Kromasil aluminizada

Antes de se testar cromatograficamente as fases de PMOS imobilizados sobre os suportes K-Al e K-2Al, utilizou-se a sílica aluminizada destes dois lotes para recheiar colunas e avaliar a influência da quantidade de alumínio sobre a sílica nas separações cromatográficas em fase normal.

Os cromatogramas resultantes da análise cromatográfica das colunas recheadas com K-Al e K-2Al estão na figura 16.

Através da figura 16 é possível verificar que uma maior quantidade de alumínio sobre a sílica faz com que haja uma melhor separação entre os componentes da mistura 3, ou seja, a presença de alumínio na sílica pode levar a um aumento na seletividade da fase. Isto é possível porque os grupos aluminóis ( $=Al-OH$ ), além de interagirem por meio de ligações de hidrogênio com os solutos polares, como os grupos silanóis da sílica, são sítios ácidos de Lewis que interagem com moléculas ricas em elétrons [34]. Assim, moléculas orgânicas insaturadas são retidas mais fortemente pela sílica aluminizada que pela sílica pura.



**Figura 16:** Cromatogramas obtidos utilizando colunas de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al (a) e K-Al (b); FM: hexano:etanol (95:5 v/v),; vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- benzeno, 2- benzoato de etila, 3- benzonitrila, 4- álcool benzílico.

## **4.7.2- Avaliações físico-químicas e cromatográficas em fase reversa das fases à base de sílica Kromasil aluminizada**

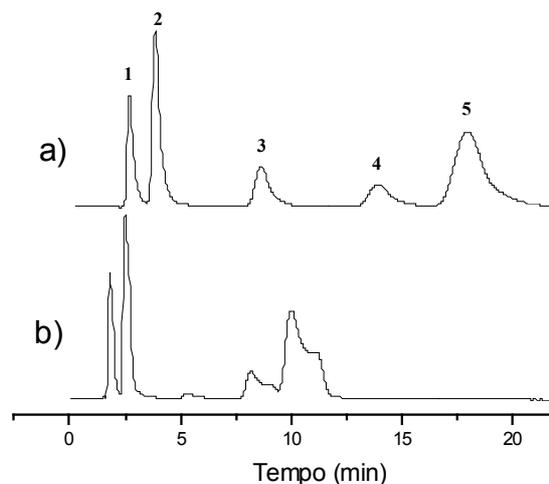
### **4.7.2.1- Avaliações das fases estacionárias com massa inicial específica de aproximadamente 1**

No processo de imobilização térmica do PMOS sobre os suportes K-Al e K-2Al utilizou-se as condições que geraram a FE à base de YMC-Al-3 que apresentou o melhor desempenho cromatográfico, ou seja, 120 °C e 8 h.

A figura 17 contém os cromatogramas obtidos a partir da análise cromatográfica das colunas recheadas com as fases de PMOS imobilizado termicamente sobre os suportes K-Al e K-2Al utilizando-se a mistura teste 1. Nestes cromatogramas é possível verificar que, assim como nos cromatogramas da figura 16, a fase que contém a maior porcentagem de alumínio no suporte apresentou um melhor desempenho cromatográfico.

Na tabela 13 estão os parâmetros cromatográficos referentes ao cromatograma da figura 17a. Não foi possível obter os parâmetros cromatográficos para a fase K-Al(PMOS).

A fase K-2Al(PMOS) apresentou um desempenho cromatográfico inferior ao apresentado pela fase YMC-Al-3(PMOS) imobilizada termicamente sob as mesmas condições, de acordo com os parâmetros cromatográficos das tabelas 9 e 13. Esta comparação mostra que, apesar da não uniformidade das partículas de sílica YMC-Gel, foi possível obter uma FE com um melhor desempenho cromatográfico que aquela obtida à partir da sílica Kromasil aluminizada. De acordo com o que é descrito na literatura [17], este comportamento vai contra o que era esperado.



**Figura 17:** Cromatogramas obtidos utilizando-se colunas de 60 x 3,9 mm, FE: (a) K-2Al(PMOS) e (b) K-Al(PMOS); FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno.

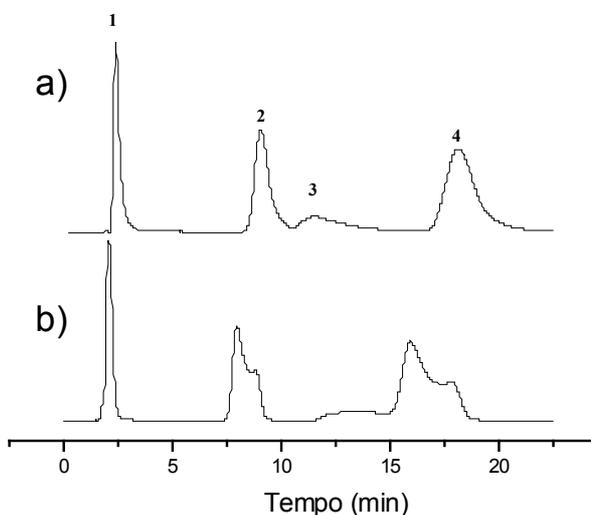
**Tabela 13:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 17a para a fase K-2Al(PMOS).

	Eficiência (N/m)	As	Rs	k	h
2- Benzonitrila	10000	1,7	2,2	0,5	20,0
3- Benzeno	14800	1,5	5,6	2,4	13,5
4- Tolueno	14900	1,5	3,6	4,6	13,4
5- Naftaleno	14800	1,4	1,9	6,2	13,5

Para avaliar o comportamento das fases K-Al(PMOS) e K-2Al(PMOS) frente a compostos com caráter ácido e básico, utilizou-se a mistura teste 2 na obtenção dos cromatogramas apresentados na figura 18.

Os parâmetros cromatográficos obtidos à partir do cromatograma da figura 18a, para a coluna recheada com a fase K-2Al(PMOS), encontram-se na tabela 14. Os valores do fator de retenção foram calculados à partir da injeção de uracil em separado

da mistura teste. Não foi possível obter os parâmetros cromatográficos à partir do cromatograma da figura 18b.



**Figura 18:** Cromatogramas obtidos utilizando-se colunas de 60 x 3,9 mm, FE: (a) K-2Al(PMOS) e (b) K-Al(PMOS); FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- fenol, 2- naftaleno, 3- N,N-dimetilanilina, 4- acenafteno.

**Tabela 14:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 18a para a fase K-2Al(PMOS).

	Eficiência (N/m)	As	Rs	k	h
1- Fenol	5400	2,4	1,2	0,3	37,1
2-Naftaleno	13900	1,9	2,7	4,2	14,4
3- N,N-DMA	2800	3,5	1,0	5,5	71,9
4- Acenafteno	13800	1,9	2,2	9,4	14,5

Os baixos valores de eficiência apresentados na tabela 14 já eram esperados, uma vez que na análise cromatográfica utilizando os compostos neutros da mistura 1 (figura 17a e tabela 13) também foram obtidas eficiências relativamente baixas para esta FE.

Na análise cromatográfica utilizando a mistura 2 (tabela 14) obteve-se, também, baixos valores de resolução e valores elevados de assimetria para o fenol e a N,N-dimetilanilina. O fenol é um ácido fraco que pode indicar se há ocorrência de interação polar e por ligação de hidrogênio com a fase estacionária, uma vez que este composto pode interagir pela parte polar e apolar de sua estrutura com a fase estacionária. A N,N-dimetilanilina é um composto básico que interage fortemente com os grupos hidroxila residuais do suporte, causando cauda no pico. Observa-se no cromatograma da figura 18a a presença de cauda no pico correspondente à N,N-dimetilanilina, fato este que, associado aos valores obtidos de assimetria e resolução para este composto e para o fenol, indicam a presença de grupos hidroxila residuais na FE.

Comparando-se essas colunas com a coluna comercial a base de alumina, verificou-se que os valores de eficiência (tabelas 7 e 8) são próximos aos valores apresentados pela fase K-AI-2(PMOS) (tabelas 13 e 14) para ambas as misturas teste.

Os valores de assimetria para compostos neutros assim como para os compostos com caráter polar, como a N,N-dimetilanilina e o fenol, estão mais próximos do valor ideal (1,0) para a fase comercial do que os valores apresentados por K-AI-2(PMOS), porém ainda são valores elevados para uma coluna comercial.

A resolução obtida entre os componentes da mistura teste para ambas as fases, comercial e K-AI-2(PMOS), apresentou valores muito próximos, indicando que a presença de uma camada de alumina sobre a sílica faz com que a fase de sílica aluminizada interaja com os solutos de forma muito semelhante à fase a base de alumina na separação dos componentes das misturas testes.

A presença de grupos hidroxila residuais é consequência da obtenção de uma camada polimérica não uniforme sobre as partículas do suporte. Para verificar se os desempenhos cromatográficos apresentados pelas fases K-1AI(PMOS) e K-2AI(PMOS) são resultado de uma quantidade insuficiente de PMOS imobilizada sobre o suporte, realizou-se o cálculo de  $m_{PMOS}$  e  $\tau$  à partir dos valores obtidos na análise elementar de carbono, utilizando as equações X, XI, XII e XIII. Os valores obtidos no cálculo destes parâmetros, assim como os valores de área superficial específica ( $S_{BET}$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) obtidos por ASAP para as fases K-1AI(PMOS) e K-2AI(PMOS), encontram-se na tabela 15.

Com base nos dados da tabela 15 é possível verificar que houve uma diminuição de mais de 50% dos valores de  $v_p$  e  $S_{BET}$  das FE com relação aos seus respectivos suportes, indicando que ocorreu a imobilização do PMOS sobre as partículas dos suportes K-1Al e K-2Al.

Os valores de  $m_{PMOS}$  e  $\tau$  calculados para K-Al(PMOS) e K-2Al(PMOS) são numericamente muito próximos. Este dado vem confirmar que o desempenho cromatográfico apresentado por estas FE é diferenciado pela quantidade de alumínio presente no suporte, ou seja, uma maior quantidade de alumínio sobre o suporte gera FE que apresentam um melhor desempenho cromatográfico.

As espessuras das camadas poliméricas ( $\tau$ ) em K-Al(PMOS) e K-2Al(PMOS) são menores que em YMC-Al-3(PMOS) imobilizada termicamente à 120 °C por 8 h ( $\tau = 1,8$ ), apesar dos suportes YMC-Al-3, K-Al e K-2Al possuírem  $d_p$  e  $v_p$  muito semelhantes. Este pode ser um dos fatores que levaram a obtenção de um melhor desempenho cromatográfico para a fase YMC-Al-3(PMOS).

**Tabela 15:** Valores de massa específica ( $m_{PMOS}$ ) e espessura de camada polimérica sobre o suporte ( $\tau$ ) calculados pelas equações X, XI, XII e XIII, a partir dos resultados obtidos pela análise elementar de carbono das fases K-Al(PMOS) e K-Al-2(PMOS), e valores de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), diâmetro de poro médio ( $d_p$ ) e volume de poro específico ( $v_p$ ) obtidos por ASAP para estas mesmas fases estacionárias e seus respectivos suportes K-Al e K-2Al.

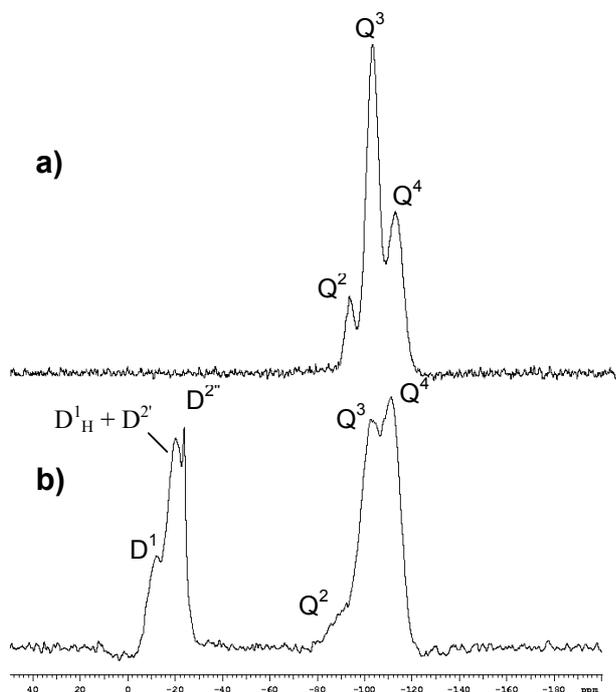
Fase	massa específica ( $g_{PMOS}/g_{suporte}$ )	espessura da camada ( $\tau$ ) (nm)	$S_{BET}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$v_p$ ( $mL g^{-1}$ )
K-1Al	-----	-----	322	0,89
K-2Al	-----	-----	298	0,87
K-Al-1(PMOS)	0,31	1,2	123	0,34
K-Al-2(PMOS)	0,37	1,5	111	0,34

Para uma melhor compreensão das alterações ocorridas na estrutura química da sílica Kromasil após sua aluminização e imobilização térmica do PMOS sobre suas

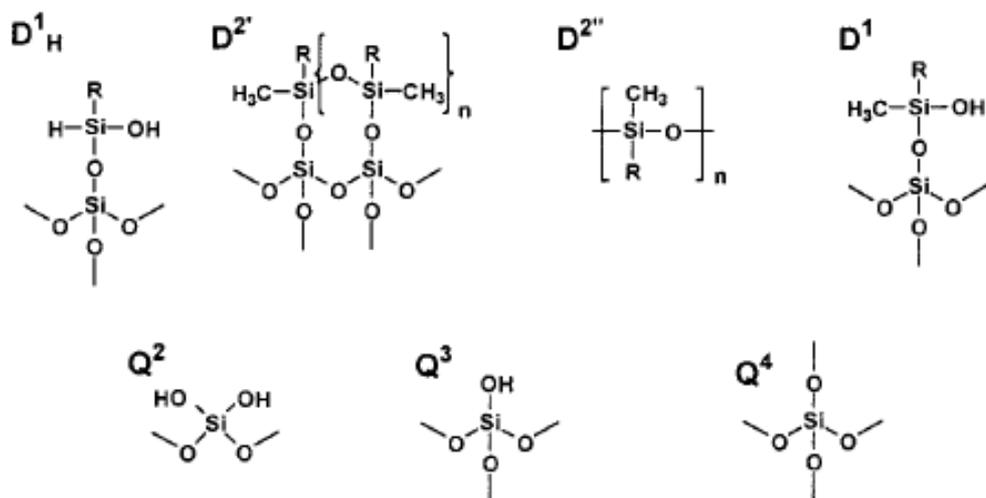
partículas, obteve-se os espectros de  $^{29}\text{Si}$  (CP/MAS) NMR da sílica Kromasil nua e da fase K-2Al(PMOS), os quais encontram-se na figura 19.

No espectro da figura 19a observa-se sinais característicos da sílica nua, referentes ao grupo siloxano ( $\text{Q}^4$ ) em -110 ppm, aos silanóis isolados ( $\text{Q}^3$ ) em -102 ppm e aos silanóis geminais ( $\text{Q}^2$ ) em -92 ppm (figura 20) [50,51]. Estes sinais também estão presentes no espectro de K-2Al(PMOS) (figura 19b) mas em razões significativamente diferentes, indicando que quase todos os silanóis geminais e um número altamente significativo dos silanóis associados e livres reagem com o isopropóxido de alumínio.

Também aparecem sinais entre -22 ppm e -29 ppm, que indicam a presença de PMOS sorvido ( $\text{D}^{2''}$ ) e quimicamente ligado ( $\text{D}^2$ ,  $\text{D}^1$  e  $\text{D}^1_{\text{H}}$ ) (figura 20). A presença de grupos  $\text{D}^{2''}$  em K-2Al(PMOS) mostra que o tratamento térmico promoveu a formação de pequenos loops pelas cadeias poliméricas sobre a superfície do suporte. Já a presença de grupos  $\text{D}^1$  e  $\text{D}^1_{\text{H}}$  indica que houve a quebra de algumas ligações Si-O-Si da cadeias do polissiloxano (PMOS) durante o processo de obtenção da FE.



**Figura 19:** Espectros de  $^{29}\text{Si}$  (CP/MAS) NMR da sílica Kromasil (a) e da fase estacionária K-2Al(PMOS) (b).



**Figura 20:** Estrutura das espécies Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> e Q<sup>4</sup> presentes no espectro de <sup>29</sup>Si (CP/MAS) NMR da sílica Kromasil e da fase estacionária K-2Al(PMOS), e D<sup>1</sup>, D<sup>1H</sup>, D<sup>2'</sup> e D<sup>2''</sup> presentes apenas no espectro de K-2Al(PMOS) [50,51].

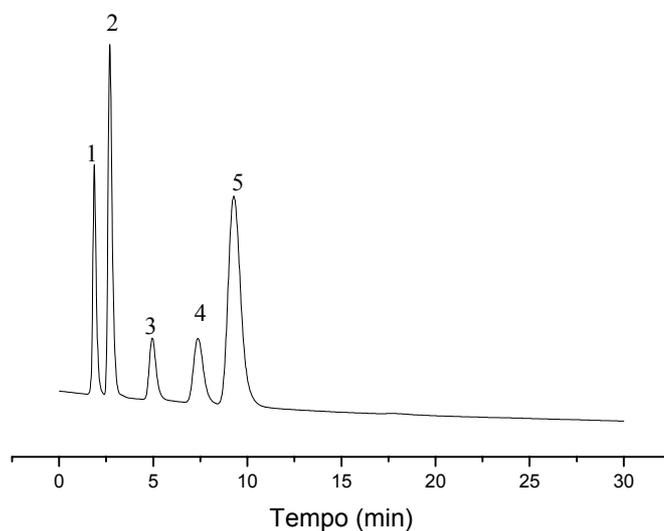
#### 4.7.2.2- Avaliações da fase estacionária obtida utilizando-se uma maior massa inicial específica

Na tentativa de melhorar o desempenho cromatográfico da FE à base de sílica Kromasil aluminizada, obteve-se uma FE sorvida partindo de uma massa inicial específica de 1,2 g de PMOS para cada 1,0 g do suporte K-2Al. Esta FE foi submetida à imobilização térmica à 120 °C por 8 h, 6 dias após o preparo da fase sorvida.

O cromatograma resultante da análise cromatográfica realizada utilizando-se a coluna recheada com esta FE encontra-se na figura 21 e os parâmetros cromatográficos obtidos à partir do cromatograma estão na tabela 16.

Comparando-se os parâmetros cromatográficos da tabela 16 com aqueles obtidos para a FE K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,0$  (tabela 13) observa-se o desempenho cromatográfico de ambas as FE é muito semelhante, uma vez que não se obteve melhoria na eficiência para a FE em que se utilizou uma maior massa inicial

específica. Houve uma pequena melhoria nos valores de assimetria para K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,2$  com relação à K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,0$ . Assim, alguns dos valores de assimetria da tabela 16 encontram-se dentro do intervalo ideal [46].



**Figura 21:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,2$  ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno.

**Tabela 16:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 21 para a fase K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,2$ .

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Benzonitrila	9400	1,5	1,4	0,3	21,3
3- Benzeno	13100	1,4	3,2	1,1	15,3
4- Tolueno	14500	1,1	2,3	1,9	13,8
5- Naftaleno	14000	1,2	1,2	2,4	14,3

Por meio da análise elementar de carbono de K-2Al(PMOS) com  $m_{PMOS}^i = 1,2$  calculou-se que a massa de PMOS imobilizada por cada grama de sílica aluminizada presente nesta FE após o processo de extração ( $m_{PMOS}$ ) é de 0,33 e a espessura da

camada polimérica formada sobre as partículas do suporte ( $\tau$ ) é de 1,3. Mesmo utilizando-se uma maior massa inicial específica e as mesmas condições de imobilização térmica, obteve-se valores menores de  $m_{\text{PMOS}}$  e  $\tau$  para esta FE do que os obtidos para K-2Al(PMOS) com  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,0$  ( $m_{\text{PMOS}} = 0,37$  e  $\tau = 1,5$ ).

Estes resultados mostram que o uso de uma maior massa de PMOS na obtenção da fase sorvida não gera uma FE com uma camada polimérica imobilizada mais espessa sobre o suporte. Isto porque, quando se utiliza  $m_{\text{PMOS}} = 1,0$  já há um excesso de polímero, se considerarmos que a quantidade de PMOS necessária para preencher os poros ( $m_{\text{poros cheios}}$ ) de K-2Al é de  $0,79 \text{ g}_{\text{PMOS}} / \text{g}_{\text{SiAl}}$ , conforme pode ser calculado utilizando-se a equação XIII.

Desta maneira, foi possível verificar que o uso de uma massa inicial específica maior não contribuiu para obtenção de uma FE à base de K-2Al com melhor desempenho cromatográfico.

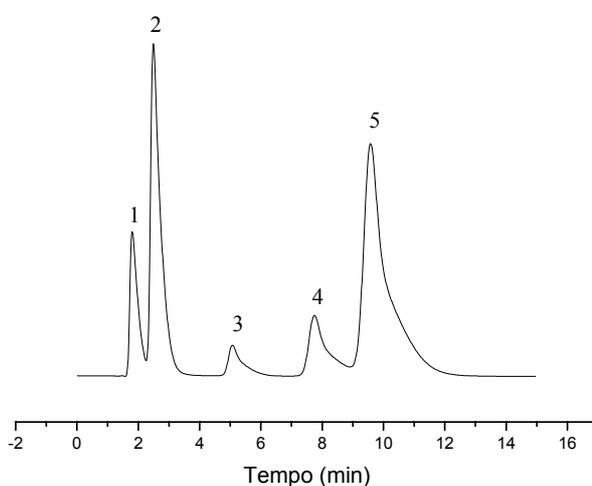
#### **4.7.2.3- Avaliações da fase estacionária obtida a partir da técnica de pulso de aquecimento**

Uma outra tentativa de obter uma FE à base de K-2Al com melhor desempenho cromatográfico foi realizada utilizando-se a técnica de imobilização térmica com pulso de aquecimento. Esta técnica baseia-se no aquecimento da FE sorvida à uma temperatura inferior àquela utilizada no processo de imobilização térmica por um certo período de tempo. Este aquecimento prévio tem por objetivo promover o estabelecimento de uma conformação favorável das cadeias poliméricas sobre a superfície do suporte, favorecendo assim, a formação de uma camada polimérica mais uniforme.

O cromatograma obtido na análise cromatográfica em que foi empregada a coluna recheada com a FE obtida pela técnica de imobilização com pulso de aquecimento (K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub>) encontra-se na figura 22 e os parâmetros cromatográficos correspondentes a este cromatograma estão na tabela 17.

**Tabela 17:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir do cromatograma da figura 22 para a fase K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub>.

	<b>Eficiência (N/m)</b>	<b>As</b>	<b>Rs</b>	<b>k</b>	<b>h</b>
2- Benzonitrila	12000	1,4	2,3	0,4	16,7
3- Benzeno	14200	1,3	4,2	1,6	14,1
4- Tolueno	15500	1,1	3,0	3,0	12,9
5- Naftaleno	15000	1,2	1,7	1,7	13,3



**Figura 22:** Cromatograma obtido utilizando-se uma coluna de 60 x 3,9 mm, FE: K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub> ; FM: MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30 v/v); vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; compostos: 1- acetona, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno, 5- naftaleno.

Comparando-se os parâmetros cromatográficos da tabela 17 com os da tabela 13 (obtidos para K-2Al(PMOS) imobilizada pelo método tradicional) observa-se que foram obtidos valores de eficiência e resolução muito parecidos. A fase K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub> apresentou melhores valores de assimetria, o que indica que foi obtida uma camada polimérica mais uniforme. Esta FE apresentou também, menores fatores de retenção, o que pode ser um indicativo de que a quantidade de PMOS imobilizado sobre o suporte é menor que aquela obtida em K-2Al(PMOS).

Para verificar a quantidade de PMOS presente em K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub>, realizou-se a análise elementar de carbono desta FE, que possibilitou determinar  $m_{\text{PMOS}} = 0,27$  e  $\tau = 1,0$ . Estes valores são inferiores aos apresentados por K-2Al(PMOS) ( $m_{\text{PMOS}} = 0,37$  e  $\tau = 1,5$ ), o que mostra que a diminuição no fator de retenção é mesmo um indicativo de que a FE apresenta uma menor camada polimérica.

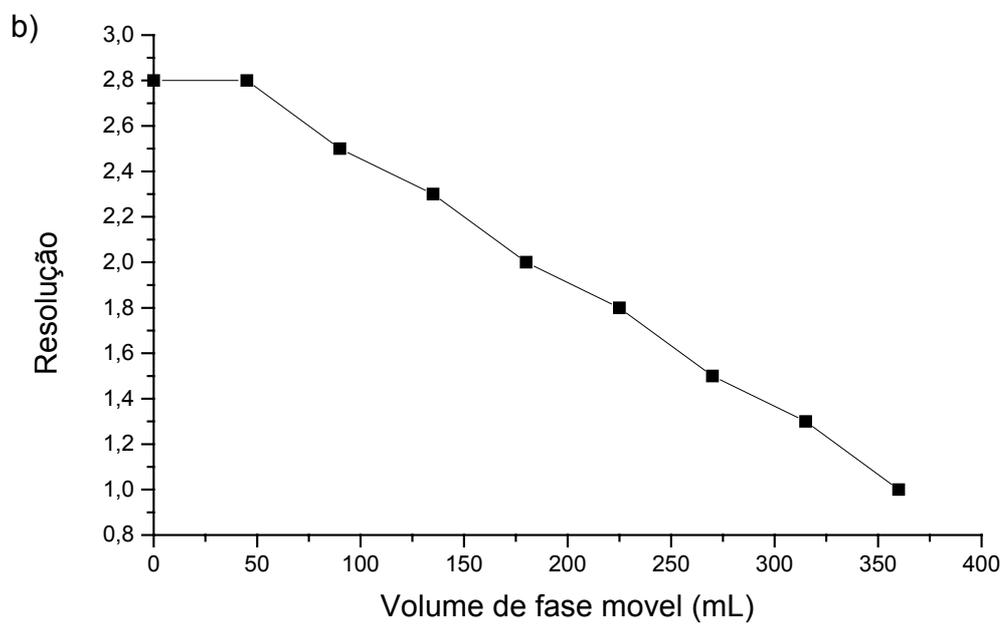
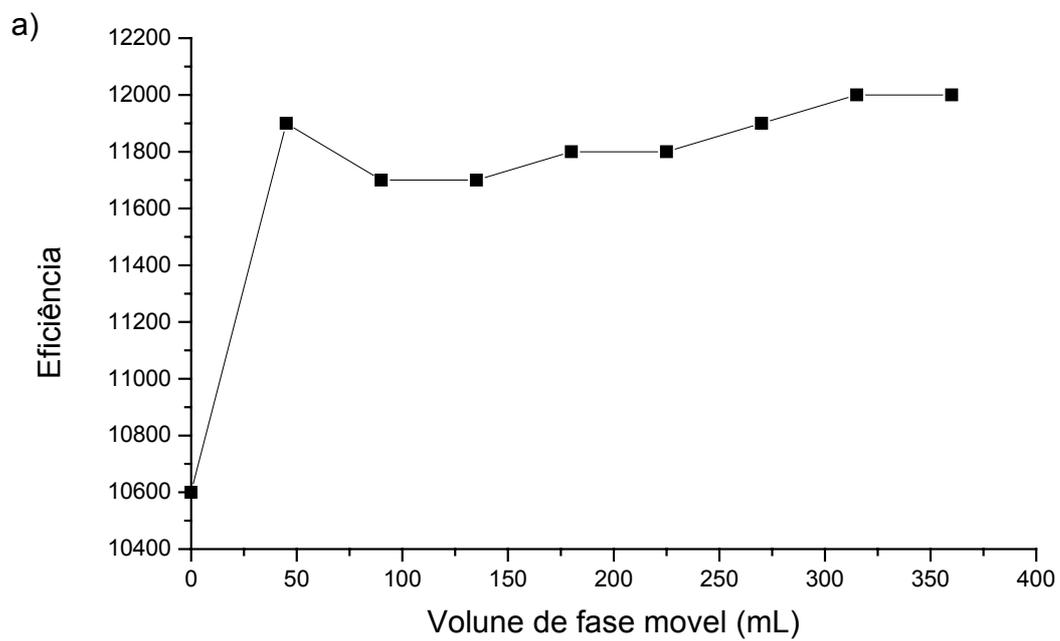
Apesar da menor quantidade de polímero sobre o suporte, obtida pelo método de imobilização com pulso de temperatura, o desempenho cromatográfico de K-2Al(PMOS)<sub>pulso</sub> foi semelhante ao de K-2Al(PMOS). Ou seja, o pulso de temperatura realmente produz FE com camadas poliméricas mais uniformes. Porém, não foi capaz de produzir uma FE com melhor desempenho cromatográfico, como era esperado.

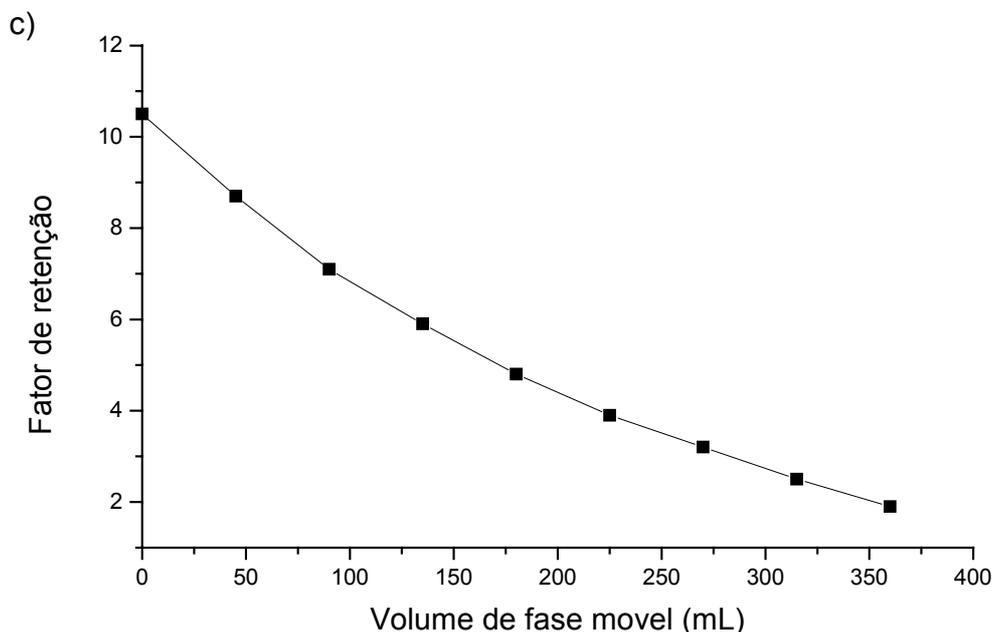
#### **4.8- Teste de estabilidade da fase estacionária K-Al(PMOS) em pH 9,0**

A fase K-2Al(PMOS) com  $m_{\text{PMOS}}^i = 1,0$  imobilizada à 120 °C por 8 h, foi testada com relação à sua estabilidade em FM com pH 9. Condições drásticas e fatores que incrementam a dissolução da sílica, como temperatura elevada e concentração de NaHCO<sub>3</sub>, foram utilizados para acelerar o teste, possibilitando obter rapidamente informações sobre a estabilidade da FE.

Na figura 23 está a representação gráfica da variação da eficiência (a), resolução (b) e fator de retenção (c) em função do volume de FM que passou através da coluna.

Verifica-se através da figura 23 que a eficiência sofre um abrupto aumento com a passagem de FM através da coluna e depois mantém-se praticamente constante, enquanto o fator de retenção e a resolução vão diminuindo gradativamente. A assimetria manteve-se constante e igual a 1,3 durante todo o procedimento.



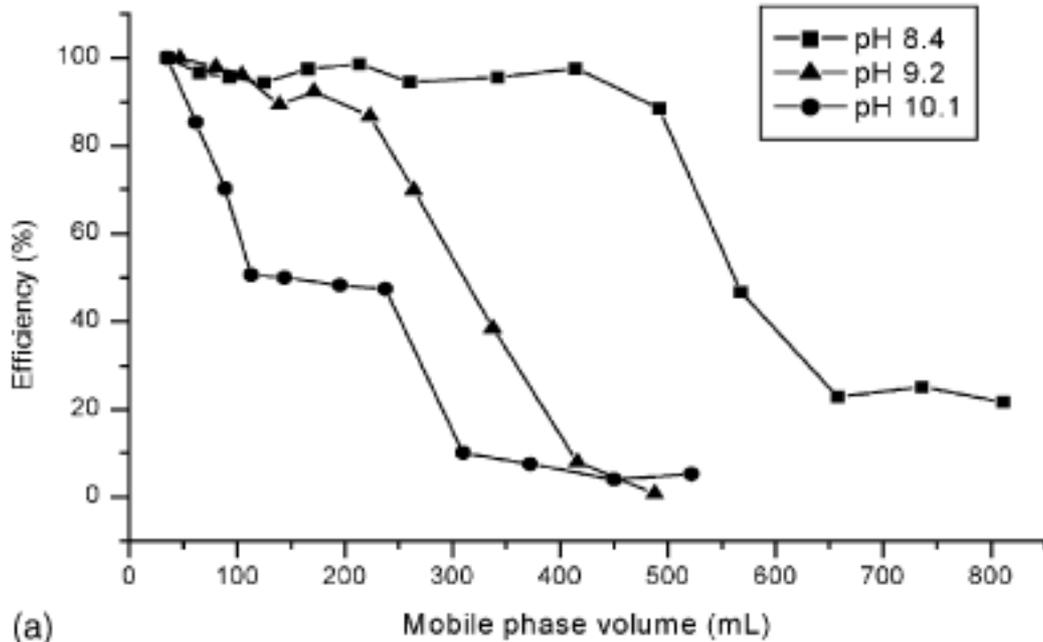


**Figura 23:** Teste de estabilidade (a) eficiência, (b) resolução e (c) fator de retenção em fase móvel básica de metanol:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3 / \text{NaOH}$ , pH 9 (50:50 v/v), à  $60^\circ\text{C}$  e vazão de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ . Avaliações feitas para o naftaleno (a,c) e o par tolueno-naftaleno (b).

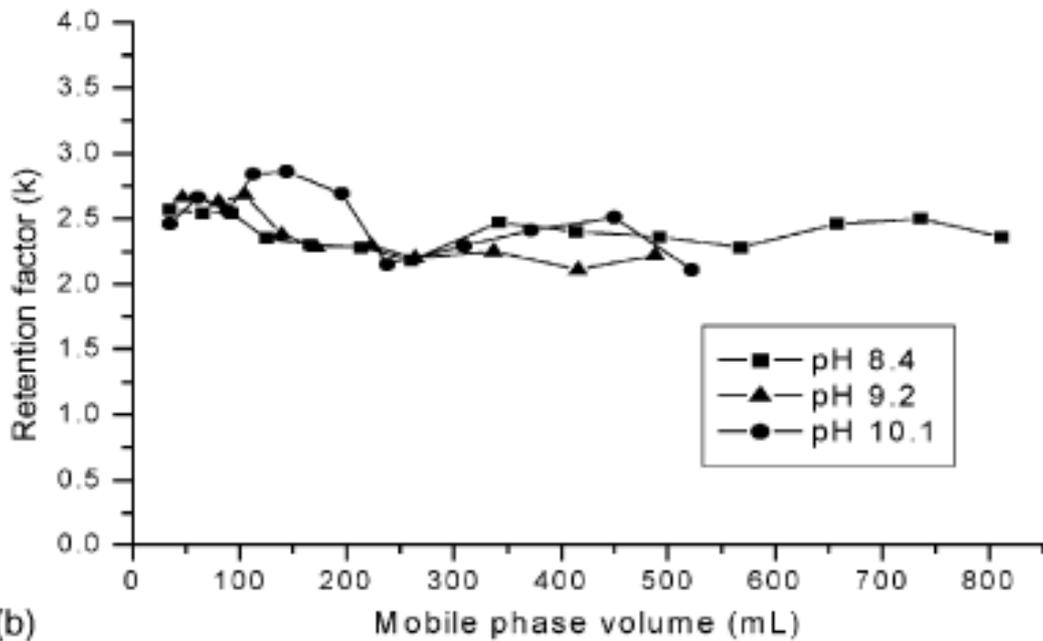
Diminuição da eficiência no decorrer de testes de estabilidade como este, são citadas na literatura [41,42] como conseqüência de mudanças no leito cromatográfico devido à dissolução do suporte. Daí, o aumento na eficiência observado no teste realizado com K-2Al(PMOS) pode indicar apenas uma mudança na distribuição da fase líquida sobre as partículas de sílica aluminizada e que a presença de alumínio sobre a sílica, não permite que haja dissolução do suporte, modificando o leito da coluna.

Porém, a queda no fator de retenção e na resolução sugerem que houve perda de fase líquida com o aumento da quantidade de FM básica percorrida através da coluna. Já a assimetria manteve-se constante porque, em geral, alterações na assimetria são uma conseqüência da diminuição da eficiência [42].

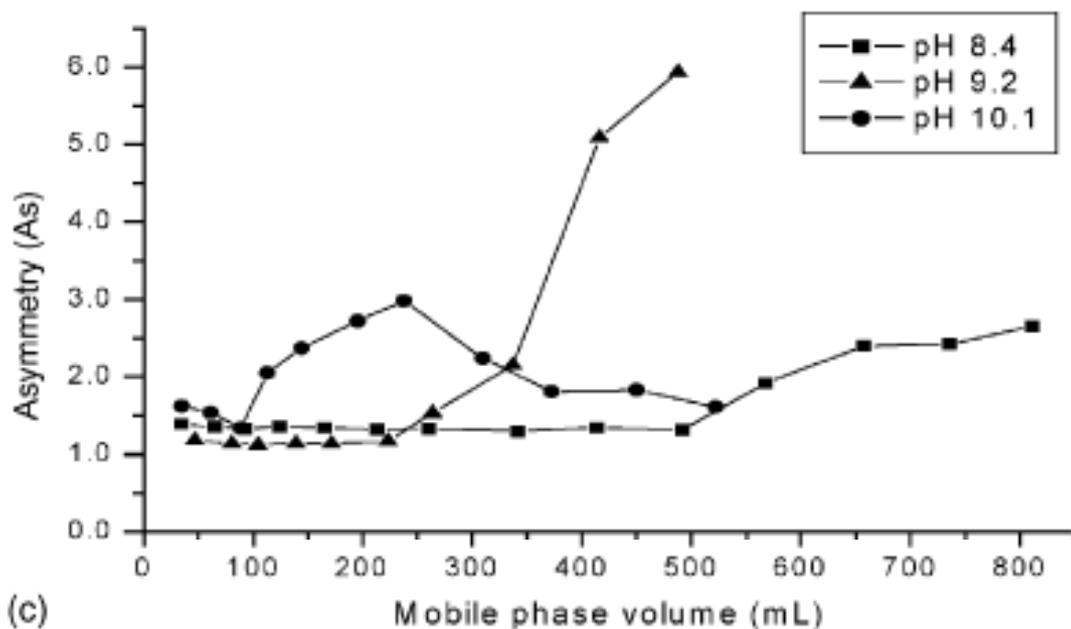
Os resultados de testes de estabilidade descritos na figura 24, foram obtidos por Fonseca e colaboradores [42] para a uma FE de PMOS auto-imobilizado por 2 meses sobre partículas de sílica Davisil (13  $\mu\text{m}$ ).



(a)



(b)



**Figura 24:** Teste de estabilidade para a fase  $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$  à  $60^\circ\text{C}$  em função do pH da fase móvel. Condições do teste de estabilidade: FM metanol  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  e solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3$  (50:50 v/v) com diferentes pH, usando uma vazão de  $1,2\text{ mL min}^{-1}$ . Condições de avaliação: FM metanol-água (70:30 v/v), vazão  $0,3\text{ mL min}^{-1}$ . Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno [42].

Na figura 24, pode ser observado que independente do pH da FM utilizado, houve queda na eficiência e, conseqüentemente, um aumento na assimetria, indicando que ocorreu dissolução da sílica com a passagem da FM através da coluna. O fator de retenção manteve-se praticamente constante durante o teste (figura 24b), mostrando que a perda da fase polimérica da coluna é mínima, apesar da dissolução da sílica.

Desta forma, é possível verificar que o comportamento da FE à base de sílica é o oposto do apresentado por K-2Al(PMOS), ou seja, a presença de alumínio quimicamente ligado na sílica aumenta a resistência da sílica à dissolução em pH alcalino.

## 5- CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer que as condições que garantem a obtenção de uma maior porcentagem de alumínio na sílica aluminizada são de 8 h de reação sob a temperatura de 80 °C. Estas condições permitiram obter sílica YMC-Gel e Kromasil aluminizadas, segundo o indicado pelas medidas de Espectrometria de Absorção Atômica em chama, área superficial, diâmetro e volume de poros, realizados nestes suportes. Os valores da razão Al / silanos, calculados para sílica Rainin e YMC-Gel, indicam que cada átomo de alumínio encontra-se ligado a um grupo silanol. Quando considerada esta mesma proporção Al / silanol para sílica Kromasil, foi verificado que é necessário submetê-la duas vezes a reação com isopropóxido de alumínio para obtenção de uma monocamada de alumínio completa sobre suas partículas.

Dentre as diferentes condições de temperatura e tempo de imobilização térmica, utilizados para obter fases estacionárias à base de sílica YMC-Gel aluminizada, aquelas que produziram a fase com melhor desempenho cromatográfico foram: 120 °C e 8 h. A fase estacionária de sílica YMC-Gel aluminizada obtida sob estas condições (YMC-Al-3(PMOS)) apresentou um bom desempenho cromatográfico, uma vez que comportou-se de maneira muito semelhante à coluna recheada com fase estacionária comercial a base de sílica Kromasil e a coluna contendo fase à base de alumina.

As medidas de análise elementar de carbono indicaram que a quantidade de polímero imobilizada em cada uma das condições avaliadas foi praticamente a mesma. Portanto, o desempenho cromatográfico apresentado pelas fases obtidas não está relacionado à espessura da camada polimérica sobre o suporte, mas sim às condições de imobilização que são responsáveis pela distribuição das cadeias poliméricas sobre o suporte.

Comparando-se os espectros de infravermelho da sílica YMC-Gel pura e aluminizada, verificou-se o desaparecimento da banda correspondente aos grupos silanóis do espectro da sílica aluminizada, indicando ter ocorrido a reação destes grupos com o isopropóxido de alumínio. Foi possível verificar, também, que realmente ocorre a imobilização do PMOS sobre as partículas do suporte, devido ao

aparecimento de bandas dos grupos  $-CH_2$  e  $-CH_3$  no espectro da fase YMC-AI-3(PMOS), as quais não estão presentes nos espectros da sílica pura e da sílica aluminizada.

A fase obtida com um maior intervalo de tempo entre a produção da fase sorvida e a imobilização térmica apresentou um desempenho cromatográfico pouco melhor que a obtida com imobilização térmica após 6 dias de sorção. Desta maneira pode-se verificar que um maior intervalo pode gerar uma distribuição mais uniforme das cadeias de polímero sobre o suporte. Porém o maior tempo necessário para obtenção da fase não é compensado pela melhoria gerada no seu desempenho.

Através da avaliação em fase normal da sílica Kromasil com diferentes porcentagens de alumínio (K-AI e K-2AI), foi possível verificar que uma maior quantidade de alumínio sobre a sílica produz colunas com melhores desempenhos cromatográficos em fase normal. O mesmo comportamento foi observado na análise cromatográfica em fase reversa, realizada com fases estacionárias obtidas sobre os mesmos suportes de sílica Kromasil com PMOS imobilizado termicamente à 120 °C por 8 h (K-AI(PMOS) e K-2AI(PMOS)).

A fase K-2AI(PMOS), apesar de ter sido obtida sob as mesmas condições em que foi obtida a fase com melhor desempenho cromatográfico a base de sílica YMC-Gel aluminizada, teve um desempenho inferior ao apresentado por YMC-AI-3(PMOS) e, conseqüentemente, inferior ao desempenho das fases estacionárias comerciais à base de sílica Kromasil ou à base de alumina. Este comportamento foi atribuído à presença de uma camada polimérica com menor espessura em K-2AI(PMOS) do que em YMC-AI-3(PMOS), conforme foi verificado pela análise elementar de carbono e confirmado pela forte interação com solutos básicos da mistura teste 2 apresentada por K-2AI(PMOS).

As medidas de CP/MAS NMR realizadas para a sílica Kromasil pura mostraram as bandas características dos diferentes silanóis presentes na superfície da sílica, assim como no espectro de K-2AI(PMOS) foram observadas bandas do PMOS sorvido e quimicamente ligado ao suporte, indicando que o tratamento térmico produz fases estacionárias onde as cadeias poliméricas estão presentes em ambas as formas.

Na tentativa de melhorar o desempenho cromatográfico apresentado pelas fases à base de sílica Kromasil aluminizada, utilizou-se uma maior massa inicial específica na produção da fase sorvida, assim como aplicou-se o método de imobilização térmica com pulso de temperatura para obtenção das fases estacionárias. Porém, em nenhum dos dois métodos utilizados obteve-se fases que apresentassem melhor desempenho cromatográfico que K-2Al(PMOS).

O desempenho cromatográfico apresentado por uma coluna comercial recheada com fase reversa à base de alumina foi similar ao apresentado por K-2Al(PMOS), mostrando que as fases à base de sílica aluminizada e alumina interagem com os solutos de maneira semelhante.

A avaliação da estabilidade de K-2Al(PMOS) permitiu verificar que a presença de alumínio sobre a sílica reduz a sua solubilidade em pH 9, de maneira que a fase estacionária à base de sílica aluminizada é degradada pela perda da fase líquida e não pela dissolução da sílica, comportamento este oposto ao apresentado por fases estacionárias à base de sílica pura.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Claessens, H.A.; van Straten, M.A.; "Review on the Chemical and Thermal Stability of Stationary Phases for Reversed-phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004) 23.
- [2] Neue, U.D.; "HPLC Columns, Theory, Technology and Practice", Wiley, New York, 1997.
- [3] Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M., Berek, D., "Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21 (1998) 267.
- [4] Van Der Voort, P., VanSant, E.F., "Silylation of the Silica Surface: A Review", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 2723.
- [5] Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., "Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 1265.
- [6] Anazawa, T.A., Carraro, F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C<sub>1</sub> and C<sub>8</sub> Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles", *J. Chromatogr.*, 697 (1995) 159.

- [7] Collins, K.E., Granja, M.L.M., Pereira Filho, R.G., Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., "The Spatial Distribution of Poly(methyloctylsiloxane) Deposited by Solvent Evaporation in the Pores of Silica Particles", *Chromatographia*, 45 (1997) 99.
- [8] Pinto, G.M.F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "C-18 Stationary Phases Sorbed on Zirconized Silica for Use in HPLC", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 25 (2002) 205.
- [9] Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., "High-performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica II. Chromatographic Evaluation", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 109.
- [10] Collins, K.E., Sá, A.L.A., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., "Thermal Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) in the Pores of Chromatographic Silica", *Chromatographia*, 53 (2001) 661.
- [11] Bottoli, C.B.G., Chaudhry, Z.F., Fonseca, D.A., Collins, K.E., Collins, C.H., "Poly(methyloctylsiloxanes) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 121.
- [12] Collins, K.E.; Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Bachmann, S.; Albert, K.; Collins, C.H., "Self-immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on High-performance Liquid Chromatographic Silica", *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 43.
- [13] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Preparation of a Polybutadiene Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation for Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 77.
- [14] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Microwave-immobilized Polybutadiene Stationary Phase for Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 225.
- [15] Fonseca, D.A., Collins, K.E., Collins, C.H., "Titanized Silica-based Stationary Phases Prepared with Thermally and Microwave-immobilized Poly(methyloctylsiloxane)", *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 209.
- [16] 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", *Quím. Nova*, 25 (2002) 616.
- [17] Poole, C.F.; Poole, S.K.; "Chromatography Today", Elsevier, New York, 1991.
- [18] Szabó, Z.; Ohmacht, R.; Huck, C.W.; Stöggel, W.M.; Bonn, G.K.; "Influence of the Pore Structure on the Properties of Silica Based Reversed Phase Packings for LC", *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 313.
- [19] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., "Practical HPLC Method Development", 2<sup>o</sup> ed. Wiley, New York, 1997.
- [20] Zhuravlev, L.T.; "The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model", *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng Aspects*, 173 (2000) 1.
- [21] Nawrocki, J.; "The Silanol Group and its Role in Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 29.
- [22] Nawrocki, J.; Moir, D.L.; Szczepaniak, W.; "Trace Metal Impurities in Silica as a Cause of Strongly Interacting Silanols", *Chromatographia*, 28 (1989) 143.
- [23] Nawrocki, J.; "Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part I", *Chromatographia*, 31 (1991) 177.
- [24] Nawrocki, J.; "Silica Surface Controversies, strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part II", *Chromatographia*, 31 (1991) 193.

- [25] Kirkland, J.J., De Stefano, J.J., "Controlled Surface Porosity Supports with Chemically Bonded Organic Stationary Phases for Gas and Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, **8** (1970) 309.
- [26] Kirkland, J.J., "High Speed Liquid Chromatography with Chemically Bonded Organic Stationary Phases", *J. Chromatogr. Sci.*, **9** (1971) 206.
- [27] Kirkland, J.J.; "Development of some Stationary Phases for Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004) 9.
- [28] Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", *J. Chromatogr.*, 549 (1991) 1.
- [29] Nahum, A., Horváth, C., "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I - Dual Retention Mechanism in Reversed-phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 53.
- [30] Kurganov, A., Davankov, V., Isageva, T., Unger, K., Eisenbeiss, F., "Characterization of Covalently Bonded and Adsorbed Polymer Coatings on Silica, Alumina and Zirconia by Means of Physico-Chemical and Chromatographic Methods", *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 97.
- [31] Zhao, J.H., Carr, P.W., "A Comparative Study of the Chromatographic Selectivity of Polystyrene-coated on Macroporous Silica Gel", *Anal. Chem.*, **72** (2000) 302.
- [32] Li, J., Reeder, D.H., McCormic, A.V., Carr, P.W., "Factors Influencing Polybutadiene Deposition within Porous Chromatographic Zirconia", *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 45.
- [33] Bottoli, C.B.G., Collins, K.E., Collins, C.H., "Chromatography Evaluation of Self-Immobilized Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatographic", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 87.
- [34] Crockford, J., King, B., Myers, P., King, D., Westlake, J., "A Review of the Chemistry and Applications of Alumina Stationary Phases in HPLC", Phase Separations Ltd., 1990.
- [35] Heinemann, G.; Köhler, J.; Schomburg, G.; "New Polymer Coated Anion-exchange HPLC-phases. Immobilization of poly(2,3 N-hydroxyethylenediamine on Silica and Alumina", *Chromatographia*, **23** (1987) 435.
- [36] Yu, J.C.; Qu, F.; Lin, J.; Lam, H.; Chen, Z.; "Ion Chromatographic Separation of Anions and Cations on Titania Packed Column", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **24** (2001) 367.
- [37] Melo, L.F.C., Collins, C.H., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with Poly(methyloctylsiloxane) Sorbed and Radiation Immobilized onto Porous Silica and Zirconised Silica", *J. Chromatogr.*, 869 (2000) 129.
- [38] Silva, R.B.; Collins, K.H.; Collins C.H.; "Effects in High-performance Liquid Chromatography of a High pH in the Mobile Phase on Poly(methyloctylsiloxane) immobilized by  $\gamma$ -radiation on Titanium-grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 137.
- [39] Pesek, J.J.; Matyska, M.T.; "Synthesis and Characterization of Titania Based Stationary Phases Using the Silanization/Hydrosilation Method", *Chromatographia*, **44** (1997) 538.
- [40] 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", *J. Chromatogr.*, 541 (1991) 303.

[41] Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., "High-performance Liquid Chromatography Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica III. Stability Evaluations", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 93.

[42] Fonseca, D.A.; Gutiérrez, H.R.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; "Rapid Method for Evaluation of Reversed-phase High-performance Liquid Chromatographic Column Stability", *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 149.

[43] Cónsul, J.M.D.; Baibich, I.M.; Benvenuti, E.V.; Thiele, D.; "Evidências da Formação de uma Monocamada de Óxido de Alumínio sobre Sílica, Através de Reações de Enxerto", *Quím. Nova*, 28-3 (2005) 393.

[44] Prado, L.L.L.; Nascente, P.A.P.; de Castro, S.C.; Gushikem, Y.; "Aluminium oxide grafted on silica gel surface: Study of the thermal stability, Structure and surface acidity", *J. Mater. Sci.*, 35 (2000) 449.

[45] Knox, J.H.; "Band Dispersion in Chromatography - A Universal Expression for the Contribution from the Mobile Zone", *J. Chromatogr. A*, 960 (2002) 7.

[46] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2ª edição, Wiley, New York, 1979.

[47] 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*, 18 (2000) 106.

[48] Majors, R.E.; "Slurry Packing Macroparticulate Columns", *LC-GC*, 2 (1984) 502.

[49] Meyer, V.; "Practical High Performance Liquid Chromatography", 3ª edição, Wiley, New York, 1999.

[50] Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fisher, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; "Self-immobilization and/or Thermal Treatment for Preparing Silica-poly(methyloctylsiloxane) Stationary Phases", *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 217.

[51] 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", *Chem. Mater.*, 13 (2001) 1874.

[52] Silvertin, R.M., Bassler, G.C., Morill, T.C., "Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos", 3ª edição, Editora Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro, 1979.