



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**GISELLE DE OLIVEIRA CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS BASEADAS EM  
POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO) IMOBILIZADO  
TERMICAMENTE SOBRE SÍLICA PARA CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

**GISELLE DE OLIVEIRA CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS BASEADAS EM  
POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO) IMOBILIZADO  
TERMICAMENTE SOBRE SÍLICA PARA CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação do Instituto de  
Química da Universidade Federal de  
Uberlândia, como requisito para obtenção do  
título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

**UBERLÂNDIA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- C331d  
2017      Carvalho, Giselle de Oliveira, 1992-  
Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas em poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica para cromatografia líquida de interação hidrofílica / Giselle de Oliveira Carvalho. - 2017.  
94 f. : il.
- Orientador: Anizio Marcio de Faria.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.10>  
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Copolímeros - Teses. 3. Cromatografia líquida - Teses. I. Faria, Anizio Marcio de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 265/PPQUI.

DATA: 25/08/2017

DISCENTE: Giselle de Oliveira Carvalho

MATRÍCULA: 11512QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas em poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica para cromatografia líquida de interação hidrofílica.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Ciência dos Materiais: Química do estado sólido.

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Cromatografia líquida de interação hidrofílica – novos materiais de separação: preparação e aplicações.

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e cinco de agosto do ano dois mil e dezessete, no Auditório II do Bloco 1B, no Campus da FACIP/UFU em Ituiutaba, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Simone Machado Goulart, do Instituto Federal de Goiás, Regina Massako Takeuchi da Universidade Federal de Uberlândia e Anizio Marcio de Faria, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será MANIACO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 05 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Simone Machado Goulart  
IFG

Profª Dra. Regina Massako Takeuchi – UFU

Orientador(a): Prof Dr. Anizio Marcio de Faria – FACIP-UFU

*Aos meus pais, Lucia e Walmir, à minha irmã Suzane, pelo apoio e confiança, por seus ensinamentos e valores a mim passados, que fazem de mim o que hoje sou e que me constroem a cada dia. A vocês, com amor, expresso o meu maior agradecimento!*

*“Só se dedicará a um assunto com toda a seriedade, alguém que esteja envolvida de modo imediato e que dele se ocupe com amor. É sempre de tais pessoas que vêm as grandes descobertas.”*

*Arthur Schopenhauer*

## *Agradecimentos*

À Deus, meu agradecimento por todos os dias! Pela infinita proteção e pelo imensurável amor, que é fonte inesgotável de toda fortaleza, coragem e sabedoria, essenciais para que eu possa trilhar o melhor caminho.

Aos meus pais Lucia e Walmir, à minha irmã Suzane e a todos os familiares, pelo amor incondicional, pelo apoio e pela torcida. Obrigada por cada incentivo e orientação. Ao Jonathan, pela amizade, carinho, paciência, pela troca de conhecimentos, e pelo companheirismo que tem sempre dedicado a mim.

Ao Prof. Dr. Anizio M. de Faria, que com muita dedicação e paciência, dedicou seu valioso tempo para me orientar em cada etapa deste trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela grandiosa contribuição com seus conhecimentos!

Aos meus amigos, os que estão perto e os que mesmo distantes torcem por mim, obrigada pela amizade. Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Cromatografia do Pontal, pelas trocas de ideias, pelos incentivos, pela companhia.

Agradeço à Prof. Dra. Rosana Maria N. de Assunção, pela atenção, contribuição e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos professores e técnicos do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia e da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho. À FAPEMIG, pelo apoio à pesquisa.

Meu eterno agradecimento, a todos que colaboraram nesta etapa. Muito obrigada!

## RESUMO

Fases estacionárias para separação de compostos polares têm sido o foco de desenvolvimento na cromatografia, uma vez que essas substâncias apresentam dificuldade de retenção na modalidade de fase reversa e retenção irreversível na modalidade de fase normal. Este trabalho apresenta o preparo de nova fase estacionária para separação de substâncias com caráter hidrofílico. Para isso, o objetivo geral desse trabalho foi preparar uma fase estacionária baseada na imobilização térmica de um copolímero, o poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (PEO), sobre partículas de sílica (5 µm). O polímero estudado e as fases estacionárias preparadas foram caracterizadas físico-química e cromatograficamente. Os resultados de caracterização físico-química obtidos pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, análise termogravimétrica e análise elementar, indicaram que o polímero foi imobilizado na superfície das partículas do suporte de sílica. Com as análises cromatográficas realizadas a partir da separação de misturas testes padrão pela fase Si(PEO), verificou-se que a fase pode atuar na modalidade de fase reversa e também possui interação hidrofílica adequada para compostos polares, pois foi capaz de separar com eficiência os compostos polares das misturas testes do protocolo de Tanaka. Com a aplicação de um planejamento fatorial fracionário, foi possível verificar quais variáveis experimentais podem influenciar significativamente na incorporação do polímero no suporte de sílica (solvente do meio reacional, tempo e temperatura de imobilização, carga polimérica). Através de um planejamento composto central, foi possível determinar as condições ótimas de preparo da fase estacionária quanto à carga polimérica e a temperatura de imobilização. A partir dos resultados, considerou-se que a fase preparada em condições ótimas, foi a fase Si(PEO) preparada em clorofórmio, com carga polimérica 50% m/m do PEO, temperatura e tempo de imobilização de 100°C e 8h, respectivamente. A fase Si(PEO) apresenta potencialidade na separação de substâncias polares, como fármacos e resíduos de agrotóxicos, requerendo fase móvel com alta composição de solvente aquoso, tornando-a um material interessante para a cromatografia líquida aquosa (PALC, do inglês *Per-Aqueous Liquid Chromatography*), promovendo uma redução significativa de resíduos orgânicos ao final do processo cromatográfico, e conseqüentemente, contribuindo para a o avanço da cromatografia líquida verde. Além disso, a fase Si(PEO) possui grande atrativo de praticidade, baixo custo e facilidade de preparação, requerendo materiais e instrumentação simples e de baixo custo.

**Palavras-chave:** Cromatografia líquida aquosa, fases estacionárias, tratamento térmico, poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano).

## ABSTRACT

Stationary phases for separation of polar compounds have been the focus of development in chromatography, since these substances present difficulty of retention in the reversed phase and irreversible retention in the normal phase chromatography. This work presents the preparation of a new stationary phase for the separation of hydrophilic substances. For this, the general objective of this work was to prepare a stationary phase based on the thermal immobilization of poly(ethylene oxide-co-dimethylsiloxane) (PEO) onto silica particles (5  $\mu\text{m}$ ). The polymer studied and the stationary phases prepared were characterized physicochemically and chromatographically. The physicochemical characterization results were obtained by scanning electron microscopy, infrared absorption spectroscopy, thermogravimetric analysis and elemental analysis. These results indicated that the polymer was immobilized on silica surface. It was verified that the Si(PEO) phase can act in the reverse phase mode and has hydrophilic interaction suitable for polar compounds, since it was able to separate efficiently polar compounds from Tanaka protocol. With the application of a fractional factorial design, it was possible to verify which experimental variables can influence significantly the incorporation of the polymer in the support of silica (solvent of the reaction medium, time and temperature of immobilization, polymeric load). Through a central composite design, it was possible to determine the optimal preparation conditions of stationary phase taking in account the loading of polymeric PEO and the immobilization temperature. From the results, it was considered that the phase prepared under optimum conditions was the Si(PEO) phase prepared in chloroform, with a loading of PEO as 50% w/w, temperature and immobilization time of 100 °C and 16 h, respectively. The Si(PEO) phase presents potential in the separation of polar substances, such as pharmaceuticals and agrochemical residues, requiring mobile phase with high aqueous solvent composition, making it an interesting material for the Per-Aqueous Liquid Chromatography, promoting a significant reduction of organic residues from chromatographic process, and consequently contributing to the advancement of green liquid chromatography. In addition, the Si(PEO) phase has a great attractiveness of practicality, low cost and ease of preparation, requiring simple and low-cost materials and instrumentation.

**Keywords:** Per-aqueous liquid chromatography, stationary phases, thermal treatment, poly(ethylene oxide-co-dimethylsiloxane).

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO DE SEPARAÇÃO HILIC EM UMA COLUNA DE SÍLICA. A PARTIÇÃO DO ANALITO (CITOSINA) ENTRE A FASE MÓVEL HIDROFÓBICA E A CAMADA AQUOSA NA SUPERFÍCIE DA FASE ESTACIONÁRIA. ....	18
FIGURA 2. TIPOS DE GRUPOS SILANÓIS E LIGAÇÕES SILOXANO NA SUPERFÍCIE DA SÍLICA: (A) ISOLADO, (B) GEMINAL, (C) LIGAÇÃO SILOXANO, (D) VICINAL. ....	20
FIGURA 3. FASES ESTACIONÁRIAS HILIC NEUTRAS TÍPICAS: (A) CIANO-, (B) AMIDA- E (C) DIOL-. ....	22
FIGURA 4. ESTRUTURA MONOMÉRICA DO POLÍMERO POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO). ....	29
FIGURA 5. CROMATOGRAMA COM AS MEDIDAS EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS. ....	30
FIGURA 6. MEDIDA DO FATOR DE ASSIMETRIA DO PICO. ....	32
FIGURA 7. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DUAS VARIÁVEIS: (♦) PLANEJAMENTO FATORIAL $2^2$ , (+) PONTO CENTRAL E (•) PLANEJAMENTO AXIAL. ....	35
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE ENCHIMENTO E ESVAZIAMENTO DE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS. ....	42
FIGURA 9. CURVA TG PARA O COPOLÍMERO POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO). ....	49
FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLECULAR DO COPOLÍMERO POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO) OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL. ....	51
FIGURA 11. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO) NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO. ....	52
FIGURA 12. GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS. (•) VARIÁVEIS PRINCIPAIS OU INTERAÇÕES ENTRE DUAS OU MAIS VARIÁVEIS. ....	55
FIGURA 13. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA HIDROFÓBICA PELAS FASES Si(PEO) OBTIDAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ . (A) EXP #1, (B) EXP #2, (C) EXP #3, (D) EXP #4, (E) EXP #5, (F) EXP #6, (G) EXP #7 E (H) EXP #8. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (40:60, v/v), VAZÃO DE 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 254 NM. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO, (5) NAFTALENO, (*) IMPUREZA. ....	57
FIGURA 14. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA HIDROFÓBICA PELA FASE Si(PEO)#2, PREPARADA EM CLOROFÓRMIO, TEMPERATURA DE IMOBILIZAÇÃO 100°C POR 8H, E CARGA POLIMÉRICA 50 % M/M. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (A) 10:90, v/v, (B) 20:80, v/v, (C) 30:70, v/v. (D) 40:60, v/v, (E) 50:50, v/v, (F) 60:40, v/v, (G) 70:30, v/v, (H) 80:20, v/v, (I) 90:10, v/v. VAZÃO DE 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 254 NM. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO, (5) NAFTALENO, (*) IMPUREZAS. ....	59

FIGURA 15. PARÂMETROS DE RETENÇÃO OBTIDOS PELO PROTOCOLO DE TANAKA PARA AS FASES ESTACIONÁRIAS Si(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ .	62
FIGURA 16. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO (A) SUPORTE CROMATOGRÁFICO DE SÍLICA (AMPLIAÇÃO DE 7K VEZES) E DA (B) (C) FASE ESTACIONÁRIA Si(PEO)#1, IMOBILIZADA A 100 °C POR 8 H, COM 25% (M/M) DE CARGA POLIMÉRICA EM HEXANO (AMPLIAÇÃO DE 1K E 7K VEZES, RESPECTIVAMENTE).	63
FIGURA 17. CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS PARA AS FASES ESTACIONÁRIAS Si(PEO)#4 E Si(PEO)#5.	64
FIGURA 18. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA (A) SÍLICA NUA E DA (B) FASE ESTACIONÁRIA Si(PEO)#1, IMOBILIZADA A 100 °C POR 8 H, COM 25% (M/M) DE CARGA POLIMÉRICA EM HEXANO.	65
FIGURA 19. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA HIDROFÓBICA PELAS FASES Si(PEO) OBTIDAS A PARTIR DO PCC. (I) EXP #9, (J) EXP #10, (K) EXP #11, (L) EXP #12, (M) EXP #13, (N) EXP #14, (O) EXP #15. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (40:60, v/v), VAZÃO DE 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 254 NM. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO, (5) NAFTALENO, (*) IMPUREZA.	69
FIGURA 20. SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS PARA A CARGA POLIMÉRICA E TEMPERATURA DE IMOBILIZAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS Si(PEO) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE, EM TERMOS DE (A) PORCENTAGEM DE CARBONO DO PEO INCORPORADA À SUPERFÍCIE DA SÍLICA E (B) EFICIÊNCIA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA, N.	70
FIGURA 21. ESTRUTURA QUÍMICA DOS FÁRMACOS: (A) CAFEÍNA, (B) DICLOFENACO DE SÓDIO, (C) PARACETAMOL E (D) CARISOPRODOL.	73
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS PELAS FASES: (A) Si(PEO) E (B) COLUNA COMERCIAL C18. COMPOSTOS: (1) PARACETAMOL, (2) CARISOPRODOL, (3) CAFEÍNA, (4) DICLOFENACO DE SÓDIO. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL ACN: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 0,005 MOL/L. 0-4 MIN (1:99, v/v); 4-5 MIN (20:80, v/v); 5-10 MIN (20:80, v/v). VAZÃO DE 1,2 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV 254 NM.	73
FIGURA 23. EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NA FASE MÓVEL SOBRE A RETENÇÃO DOS COMPOSTOS. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL, ACN:H <sub>2</sub> O. VAZÃO DE 1,2 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 254 NM.	75
FIGURA 24. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA FASE MÓVEL SOBRE A RETENÇÃO DOS COMPOSTOS. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL, ACN:CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> . VAZÃO DE 1,2 mL MIN <sup>-1</sup> , TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 254 NM.	76
FIGURA 25. ESTRUTURA QUÍMICA DOS AGROTÓXICOS ESTUDADOS: (A) 2,4-D; (B) CAPTAN; (C) CARBOXINA; (D) CLORPIRIFÓS; (E) DIURON; (F) METOMIL; (G) TERBUTILAZINA; (H) TIOFANATO METÍLICO.	77

FIGURA 26. CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DOS AGROTÓXICOS (1) 2,4 D, (2) METOMIL, (3) TIOFANATO METÍLICO, (4) CARBOXINA, (5) CAPTANA, (6) DIURON, (7) TERBUTILAZINA E (8) CLORPIRIFÓS PELAS FASES: (A) Si(PEO)#2 E (B) C<sub>18</sub> COMERCIAL. CONDIÇÕES: MeOH:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v), 1,2 mL min<sup>-1</sup>, 25 °C, DETECÇÃO UV A 230 NM..... 78

FIGURA 27. CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DE AGROTÓXICOS PELA COLUNA COMERCIAL C18. COMPOSTOS: (1) 2,4 D, (2) METOMIL, (3) TIOFANATO, (4) CARBOXINA, (5) CAPTANA, (6) DIUROM, (7) TERBUTILAZINA E (8) CLORPIRIFÓS. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: MeOH: H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). VAZÃO DE 1,2 mL min<sup>-1</sup>, TEMPERATURA DE 25 °C, DETECÇÃO UV A 230 NM..... 79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE FASES Si(PEO). ....	40
TABELA 2. MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DA FASE Si(PEO). VARIÁVEIS: 1- SOLVENTE, 2- TEMPERATURA, 3- TEMPO E 4- CARGA DE PEO. ....	40
TABELA 3. PORCENTAGEM DE CARBONO NAS FASES Si(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM UM PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ . ....	53
TABELA 4. MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ PARA AS INTERAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS AVALIADAS NO PREPARO DE FASES Si(PEO) E PORCENTAGENS DE CARBONO. ....	55
TABELA 5. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE DESEMPENHO E PORCENTAGEM DE CARBONO DAS FASES Si(PEO) PREPARADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $2^{4-1}$ . ....	58
TABELA 6. PROPRIEDADES DE RETENÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDAS COM A SEPARAÇÃO DAS MISTURAS DE TANAKA PELAS FASES Si(PEO) PREPARADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. ....	60
TABELA 7. MATRIZ PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL. $x_2$ E $x_4$ REPRESENTAM OS VALORES DAS DUAS VARIÁVEIS CODIFICADOS PELAS EQUAÇÕES: $x_2 = T - 12525$ E $x_4 = C - 37,512,5$ . ....	67
TABELA 8. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE DESEMPENHO E PORCENTAGEM DE CARBONO DAS FASES Si(PEO) PREPARADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL. ....	68

## LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

A <sub>s</sub>	fator de assimetria a 10% da altura do pico
C <sub>18</sub>	octadecil, C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> -
C <sub>8</sub>	octil, C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> -
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FN	cromatografia líquida de fase normal
CLAE-FR	cromatografia líquida de fase reversa
CP	carga polimérica
E <sub>f</sub>	Efeito de uma variável
FE	fase(s) estacionária(s)
FEQL	fases estacionárias quimicamente ligadas
FM	fase(s) móvel(is)
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
H	altura de um prato
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de interação hidrofílica)
k	fator de retenção
L	comprimento da coluna
LC-LC	<i>Liquid chromatography-liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida bidimensional)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
N	número de pratos ou eficiência da coluna
N/m	número de pratos por metro
PALC	<i>Per-aqueous Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida Aquosa)
PCC	planejamento Composto Central
PDAS	poli(dimetil- <i>co</i> -alquilmetilsiloxano)
PDMS	poli(dimetilsiloxano)
PEO	poli(óxido de etileno- <i>co</i> -dimetilsiloxano)
PMODS	poli(metiloctadecilsiloxano)
PMOS	poli(metiloctilsiloxano)
PMTDS	poli(metiltetradecilsiloxano)
R <sub>s</sub>	resolução entre dois picos adjacentes
Si(PEO)	fase estacionária baseada na imobilização do poli(óxido de etileno- <i>co</i> -dimetilsiloxano)

$t'_R$	tempo de retenção ajustado
TG	análise termogravimétrica
$t_M$	tempo de retenção de um composto não retido
$t_R$	tempo de retenção
UV	região compreendida pela radiação ultravioleta
$W_b$	largura do pico na linha de base
$W_h$	largura do pico à meia altura

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 MECANISMOS DE SEPARAÇÃO EM HILIC E EM PALC	17
1.2 SUPORTES CROMATOGRÁFICOS	19
1.3 FASES ESTACIONÁRIAS HILIC	21
1.3.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas	21
1.3.2 Fases estacionárias imobilizadas por polímeros	24
1.3.2.1 Imobilização polimérica por tratamento térmico	26
1.3.2.2 Imobilização polimérica via radiação gama	26
1.3.2.3 Imobilização polimérica via irradiação micro-ondas	27
1.4 SELETIVIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA BASEADA EM POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO)	27
1.5 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE FASE ESTACIONÁRIA	29
1.5.1 Mistura Hidrofóbica	33
1.5.2 Mistura teste de Tanaka e colaboradores	33
1.6 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	34
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
3.1 EQUIPAMENTOS	37
3.2 REAGENTES E SOLVENTES	37
3.3 AGROTÓXICOS E FÁRMACOS	38
3.3.1 Agrotóxicos	38
3.3.2 Fármacos	38
3.4 PREPARAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS	38
3.4.1 Ativação da sílica cromatográfica	38
3.4.2 Sorção do poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) sobre sílica	39
3.4.3 Imobilização do polímero sobre a sílica	39
3.4.4 Extração do polímero não imobilizado	40
3.5 ENCHIMENTO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	41
3.5.1 Suspensão da fase estacionária	41
3.5.2 Enchimento da coluna com a suspensão da fase estacionária	41
3.5.3 Condicionamento das colunas cromatográficas	42
3.6 PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL	43
3.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO POLÍMERO PEO	43

3.7.1	<i>Análise termogravimétrica</i>	43
3.7.2	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	43
3.7.3	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho</i>	44
3.8	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FASES Si(PEO)	44
3.8.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	44
3.8.2	<i>Análise termogravimétrica</i>	44
3.8.3	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho</i>	45
3.8.4	<i>Análise Elementar</i>	45
3.9	CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES Si(PEO)	45
3.9.1	<i>Mistura hidrofóbica</i>	45
3.9.2	<i>Mistura teste de Tanaka e colaboradores</i>	46
3.10	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA Si(PEO)	46
3.10.1	<i>Separação de fármacos</i>	46
3.10.1.1	<i>Efeito do teor de água na fase móvel</i>	47
3.10.1.2	<i>Efeito da concentração de acetato de amônio na fase móvel</i>	47
3.10.2	<i>Separação de agrotóxicos</i>	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PEO	49
4.1.1	<i>Análise termogravimétrica</i>	49
4.1.2	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	50
4.1.3	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho</i>	52
4.2	AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE AFETAM A IMOBILIZAÇÃO DO PEO SOBRE A SÍLICA	52
4.3	CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES Si(PEO)	56
4.3.1	<i>Mistura teste hidrofóbica</i>	56
4.3.2	<i>Misturas testes de Tanaka e colaboradores</i>	60
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FASES Si(PEO)	63
4.4.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	63
4.4.2	<i>Análise termogravimétrica</i>	64
4.4.3	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho</i>	65
4.5	OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DAS FASES Si(PEO)	67
4.5.1	<i>Planejamento composto central (PCC)</i>	67
4.6	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA Si(PEO)	72
4.6.1	<i>Separação de fármacos</i>	72
4.6.1.1	<i>Efeito do teor de água na fase móvel</i>	74
4.6.1.2	<i>Efeito da concentração do sal na fase móvel</i>	76
4.6.2	<i>Separação de agrotóxicos</i>	77

<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais versátil e mais abrangente para separar misturas de compostos com as mais variadas estruturas químicas. A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (DEGANI; CASS; VEIRA, 1998).

O grande crescimento da CLAE deve-se a sua aplicação na modalidade de fase reversa (CLAE-FR), o qual o sistema consiste em uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade. As fases estacionárias reversas são constituídas de espécies orgânicas apolares ligadas quimicamente, imobilizadas ou apenas sorvidas a um suporte cromatográfico, normalmente um óxido inorgânico. As diferentes combinações entre espécies orgânicas e a variedade de óxidos inorgânicos resultam em fases estacionárias com diferentes seletividades, podendo ser aplicadas em várias áreas científicas, como indústrias farmacêuticas, alimentícias, agropecuárias e químicas, e em agências reguladoras que tratam questões ambientais (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

A CLAE na modalidade de fase reversa impulsionou e continua impulsionando as pesquisas em busca do aprimoramento desta técnica, principalmente referente ao desenvolvimento de novos materiais a serem utilizados como fases estacionárias (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). A ampla utilização desta modalidade está associada à facilidade de analisar substâncias, desde moderadamente polares até altamente apolares, com alta eficiência e em tempos relativamente curtos (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Apesar da ampla utilização, a CLAE-FR tem apresentado limitações importantes que tem restringido seu campo de aplicação. Uma das limitações do uso da fase reversa é a baixa retenção de moléculas polares ou iônicas, e para minimizá-la, uma nova modalidade da cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*) tem sido proposta para separações de compostos polares que não são bem resolvidos em CLAE-FR (ROJO; BARBAS; RUPÉRE, 2012; BICKER *et al.*, 2013; WELDU *et al.*, 2013).

A HILIC é um modo alternativo da cromatografia líquida de alta eficiência para separar substâncias com características polares. O termo HILIC refere-se à afinidade pela água e foi empregado pela primeira vez por Alpert, em 1990, que utilizou fases estacionárias com substâncias hidrofílicas quimicamente ligadas à superfície da sílica no intuito de promover a

separação de aminoácidos entre outros compostos polares, obtendo eluições em ordem oposta às aquelas obtidas em CLAE-FR (ALPERT, 1990).

A HILIC pode ser caracterizada como uma técnica cromatográfica que emprega fases estacionárias da cromatografia líquida de fase normal (CLAE-FN) em combinação com fases móveis típicas de CLAE-FR, contendo mais de 75% de solvente orgânico misturado à água (JANDERA, 2011; BUSZEWSKI; NOGA, 2013). A ordem de eluição é reversa se comparada à CLAE-FR, ou seja, compostos hidrofílicos são retidos mais fortemente que compostos hidrofóbicos. Portanto, a ordem de eluição dos compostos é similar à obtida em CLAE-FN. No entanto, o termo HILIC foi utilizado para distinguir esta modalidade da cromatografia de fase normal, uma vez que em CLAE-FN a fase móvel é não aquosa, constituída de solventes imiscíveis em água, enquanto que na HILIC a fase móvel emprega solventes completamente miscíveis em água, e um dos componentes é a própria água (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006).

Na cromatografia líquida de fase reversa, o metanol é o solvente mais empregado em separações, porém em HILIC, sua força cromatográfica é maior, o que diminui a retenção dos analitos. Portanto, a acetonitrila, por ser um solvente mais fraco (menor força cromatográfica), foi selecionado como “solvente clássico” de HILIC. Em HILIC, a fase móvel típica utilizada nas separações consiste em uma mistura contendo um solvente aprótico como a acetonitrila (com proporção maior que 70%, geralmente entre 70-95%) e água (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016).

Apesar de o acrônimo HILIC ter sido proposto em 1990, foi a partir de 2003 que houve um aumento em estudos envolvendo esta modalidade da cromatografia líquida, devido a necessidade de análise de compostos polares que não são bem separados por materiais de fase reversa e o aumento constante da complexidade das amostras (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; BOERSEMA; MOHAMMED; HECK, 2008). Adicionalmente, o crescimento da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização electrospray (LC-ESI-MS, do inglês *liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry*) para medidas analíticas tem levado a um aumento na procura por condições cromatográficas que permitam um melhor acoplamento entre essas duas importantes técnicas instrumentais (CUBBON *et al.*, 2007). Nesta busca, atenta-se que as condições de fases móveis que são usadas no modo HILIC são altamente compatíveis com a espectrometria de massas, pois a alta porcentagem de solvente orgânico pode potencialmente aumentar a sensibilidade da fonte de ionização ESI-MS (FOUNTAIN *et al.*, 2010; DOUSA *et al.*, 2011). Além disso, a separação por HILIC é ortogonal à separação por fase reversa, tornando-a viável para a separação multidimensional (LC-LC) de amostras complexas (SOMMELLA *et al.*, 2012).

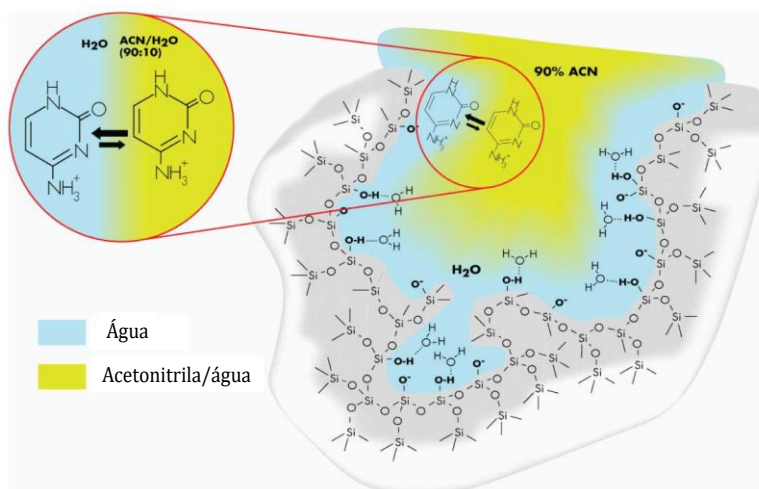
Devido à necessidade crescente de separação de compostos altamente polares em análises clínicas e de compostos farmacêuticos, nas áreas da metabolômica, proteômica, glicômica; e de compostos polares que apresentam baixa retenção no modo de fase reversa, como peptídeos, ácidos nucleicos e agrotóxicos, neste trabalho, a proposta fundamenta-se na preparação de uma nova geração de fases estacionárias de interação hidrofílica para CLAE visando oferecer retenção suficiente para estes compostos polares (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016). A habilidade de fornecer retenções mais fortes e seletividades diferentes para compostos fortemente polares se comparados com a CLAR-FR, estão entre as principais razões para o aumento da popularidade da modalidade HILIC como técnica de separação (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

No entanto, a técnica HILIC apresenta como principal desvantagem a utilização de uma alta porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, como por exemplo acetonitrila, que além de ser um solvente de alto custo é considerado nocivo para o meio ambiente. Esta condição se contrapõe aos esforços realizados em se promover a cromatografia líquida verde, uma vez que a CLAE é reconhecidamente uma técnica analítica consumidora de solventes orgânicos tóxicos e caros e geradora de grandes volumes de resíduos perigosos para o ambiente e de difícil recuperação (PLOTKA *et al.*, 2013). Para reduzir o uso de solventes nocivos e para ajudar a realizar uma cromatografia líquida verde e, conseqüentemente, proteger o meio ambiente dos riscos provocados pelos resíduos orgânicos da CLAE, um novo modo de cromatografia líquida tem sido proposto como substituição dos processos HILIC para a análise e separação de compostos polares que consomem altos teores de acetonitrila, a cromatografia líquida aquosa (PALC, do inglês *per-aqueous liquid chromatography*) (PEREIRA *et al.*, 2009; GRITTI, *et al.*, 2010; CHEN, *et al.*, 2017). O modo PALC é denominado o inverso de HILIC e a fase móvel contém uma elevada porcentagem de água (70% -100%) (PEREIRA, *et al.* 2009).

### **1.1 Mecanismos de separação em HILIC e em PALC**

Na HILIC, segundo Alpert, durante a eluição da fase móvel aquosa as moléculas de água adsorvem na superfície polar da fase estacionária, formando uma camada. O soluto que também possui característica polar, estabelece um equilíbrio de partição com a camada de água superficialmente formada por meio de interações hidrofílicas. A Figura 1, apresenta o processo de interação do analito com a camada aquosa imobilizada na superfície de uma fase estacionária de sílica (ALPERT, 1990).

Figura 1. Mecanismo de separação HILIC em uma coluna de sílica. A partição do analito (citosina) entre a fase móvel hidrofóbica e a camada aquosa na superfície da fase estacionária.



FONTE: Adaptado de [www.waters.com](http://www.waters.com)

Nesse processo, a separação ocorre devido às interações dipolo-dipolo (ligações de hidrogênio) que contribuem para a partição do analito entre a camada aquosa na superfície da fase estacionária e a fase móvel orgânica. Com o aumento da concentração de solvente orgânico na fase móvel, a retenção de muitos compostos aumenta, ou seja, quanto menor a porcentagem de água na fase móvel menor será a força de eluição do eluente (JIN *et al.*, 2008).

McCalley e Neue (2008) demonstraram experimentalmente a existência desta camada rica em água na superfície da sílica pela medida do tempo de retenção do benzeno e tolueno quando foram empregadas fases móveis com altas concentrações de acetonitrila, acima de 70%. Os autores observaram que uma porcentagem significativa do volume de poros da fase estacionária é ocupada pela camada rica em água, sob condições típicas de HILIC, e a espessura dessa camada aquosa aumenta conforme aumenta a quantidade de água na fase móvel.

Em PALC a retenção é governada essencialmente pelo mecanismo de fase reversa, no entanto as características mais polares da fase estacionária podem garantir uma maior interação de compostos polares, fazendo com que as fases móveis apresentem maior força cromatográfica quando da presença de maiores quantidades de componente aquoso. A separação pode ser finamente ajustada pelo controle do pH e da força iônica da fase móvel, bem como a velocidade de separação pode ser controlada pela adição de pequenas quantidades de um solvente ‘mais verde’ como o etanol (PEREIRA *et al.*, 2009).

## 1.2 Suportes cromatográficos

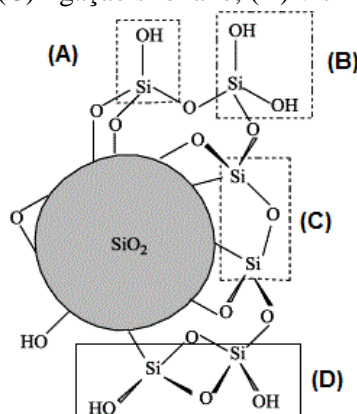
As fases estacionárias em CLAE são constituídas de um líquido estacionário ligado, sorvido ou imobilizado a um suporte cromatográfico. Para que um material possa ser utilizado como suporte cromatográfico no preparo de fase estacionária, visando melhor desempenho cromatográfico em análises, deve possuir as seguintes características (MEYER, 2010):

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

Os primeiros materiais empregados como suporte cromatográfico foram os óxidos inorgânicos de silício ( $\text{SiO}_2$  – sílica) e de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  – alumina). Por mais de 40 anos o material mais utilizado como suporte cromatográfico na preparação de fases estacionárias tem sido a sílica, pois possui características favoráveis para aplicações cromatográficas, atendendo a maioria dos requisitos citados anteriormente. Além disso, é comercialmente disponível em uma grande variedade de tamanho de partículas e formas (TONHI *et al.*, 2002). Dentre as principais características da sílica, podem ser destacadas: partículas pequenas e esféricas disponíveis em uma ampla variedade de diâmetro (1 a 20  $\mu\text{m}$ , a maioria com distribuição estreita de tamanho de partículas) e tamanhos de poros (6 a 400 nm); partículas altamente porosas com grande área superficial (100 a 500  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ); força mecânica (elevada rigidez) adequada para resistir às altas pressões necessárias em CLAE, e; facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos reativos, os silanóis ( $\text{Si-OH}$ ) (ZHURAVLEV, 2000).

Há três tipos de grupos silanóis na superfície da sílica amorfa e também ligações siloxano expostas ( $\text{Si-O-Si}$ ), que são responsáveis pela estrutura rígida do óxido (ZHURAVLEV, 2000), conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica: (A) isolado, (B) geminal, (C) ligação siloxano, (D) vicinal.



Fonte: PRADO *et al.*, 2005.

Apesar de a sílica ser o melhor material utilizado como suporte cromatográfico na preparação de fases estacionárias, ela possui duas limitações: a primeira restringe a sua utilização em uma faixa de pH 2 a 8, para que não ocorra sua dissolução; a segunda, a presença de grupos silanóis residuais em sua superfície. Em meio ácido, pH menor que 2, os grupos orgânicos ligados à sílica são mais facilmente lixiviados, pois as ligações  $\equiv\text{Si-O-Si-C}$  responsáveis por manter esses grupos imobilizados, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Em meio básico, pH maior que 8, a exposição da fase móvel com a parte do suporte que não reagiu com o grupo orgânico (silanóis residuais) promove a dissolução da sílica e, conseqüentemente, a perda do líquido estacionário e a deterioração do leito cromatográfico (SILVA *et al.*, 2004).

O segundo problema associado ao uso da sílica como suporte cromatográfico é devido ao incompleto recobrimento de sua superfície restando grupos ativos ( $\text{Si-OH}$ ), silanóis residuais, que não reagiram com o modificador orgânico e que podem alterar o mecanismo de separação.

No início do desenvolvimento da CLAE-FR, o óxido de alumínio foi muito estudado como substituto à sílica e ainda é muito utilizado na modalidade de cromatografia de fase normal (CLAE-FN). As partículas de alumina são semelhantes às partículas de sílica, apresentando elevada resistência mecânica sob altas pressões e estrutura de poros similar. Além disso apresentam estabilidade química na faixa de pH de 1 a 13, permitindo a separação de compostos básicos sem o uso de reagente par iônico ou de supressão iônica (PARK *et al.*, 2005; BAHABAD; NASSAJ, 2008). Como suporte cromatográfico para CLAE-FR, a alumina apresentou uma série de dificuldades com relação à modificação de sua superfície, associada à menor reatividade dos seus grupos OH superficiais (KURGANOV *et al.*, 1994).

Neste trabalho, foi proposto a modificação da superfície da sílica por possuir características que visam o melhor desempenho cromatográfico e possuir maior atividade química superficial comparada à alumina.

### 1.3 Fases estacionárias HILIC

De acordo com as características de um sistema HILIC ou PALC, qualquer superfície cromatográfica com caráter mais polar pode ser usada para separações. Fases estacionárias a base de sílica permanecem como as mais interessantes, principalmente devido às características da sílica compatíveis com sistemas cromatográficos. Por possuir alta concentração de grupos ativos (silanóis) em sua superfície, a sílica é facilmente modificada, e essa característica foi de extrema importância para o desenvolvimento das fases do tipo siloxano, que marcaram o início do desenvolvimento da tecnologia de colunas cromatográficas em CLAE (KIRKLAND, 2004). Em HILIC ou PALC, esta modificação da superfície da sílica permanece como um dos pilares da preparação de fases estacionárias seletivas e que permitem rápidas transferências de massas no processo de separação (WU; BICKER; LINDNER, 2008; JANDERA, 2011; CHEN *et al.*, 2017).

#### 1.3.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas

O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência está associado ao desenvolvimento da tecnologia de preparo das fases estacionárias. Este desenvolvimento foi impulsionado pela introdução das fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL), em especial, para a cromatografia líquida da modalidade de fase reversa. Antes de surgirem esses novos materiais, quimicamente ligados, o recheio da coluna cromatográfica era constituído de um líquido estacionário de baixa massa molar apenas sorvido ao suporte cromatográfico. A manutenção da concentração constante do líquido estacionário no suporte se mostrava difícil e ineficiente com o emprego de vazões mais altas da fase móvel e não era possível realizar separações no modo de eluição por gradiente, as quais eram frequentemente desejadas para separação de misturas complexas. A introdução das FEQL para CLAE-FR, na qual cadeias orgânicas foram ligadas covalentemente à superfície do suporte, fornecendo alta estabilidade ao líquido estacionário, eliminou essas limitações (KIRKLAND, 2004).

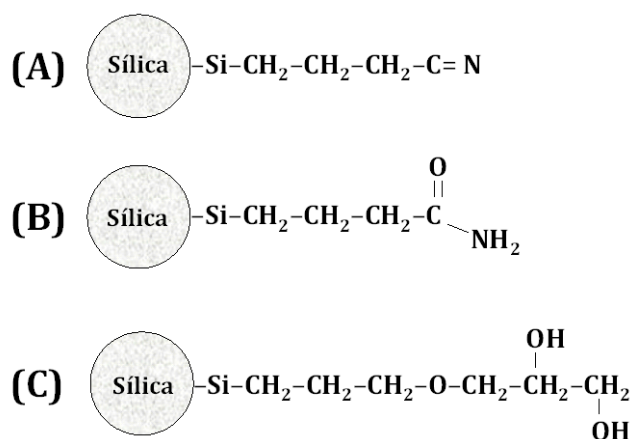
Muitas colunas recheadas com partículas de sílica nua, ou não modificada, têm sido testadas para separações de compostos polares de forma bem-sucedida, principalmente, para análises de compostos de baixa massa molar e de amostras mais simples (GRUMBACH *et al.*,

2004; MCCALLEY, 2008). No entanto, devido às adsorções irreversíveis de substâncias na superfície da sílica nua, o que provoca baixa repetitividade de tempos de retenção e eficiência de separação limitada, seu uso tem sido restrito (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). Fases estacionárias com grupos polares quimicamente ligados sobre a superfície de partículas de sílica têm sido empregadas em separações de substâncias polares mais complexas. Estas fases são normalmente preparadas pela modificação química da superfície da sílica gel pelas reações com trialcóxissilanos,  $\text{RSi}(\text{OR}')_3$ , em que R e R' correspondem a grupos polares e alquilas, respectivamente (JANDERA, 2011; BUSZEWSKI; NOGA, 2012; CHEN *et al.*, 2017).

As fases estacionárias quimicamente ligadas para separações de compostos polares podem ser classificadas como zwitteriônicas, carregadas ou neutras, de acordo com características de carga elétrica dos grupos funcionais (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006). As fases zwitteriônicas são uma classe relativamente nova para separações em HILIC, baseada no caráter zwitteriônico de um grupo funcional. Um exemplo de fase desta classe, é a sulfoalquilbetaína, que foi inicialmente desenvolvida para a separação de sais inorgânicos e pequenos compostos iônicos. Nas fases estacionárias carregadas, os grupos funcionais suportam a faixa de pH da fase móvel normalmente utilizada em CLAE (pH 3-7). A fase amino é um exemplo típico desta categoria e é amplamente utilizada para separações de açúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos e alguns produtos farmacêuticos (LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

As fases estacionárias neutras possuem grupos funcionais polares que não estão carregados eletricamente na faixa de pH típica das fases móveis empregadas em CLAE. A maioria das fases quimicamente ligadas pertencem à essa categoria e apresentam uma ampla variedade de grupos funcionais. Os principais grupos funcionais estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Fases estacionárias HILIC neutras típicas: (A) ciano-, (B) amida- e (C) diol-.



Nesta classe, a fase amida é a mais popular e tem encontrado importantes aplicações em HILIC, como na separação de proteínas e peptídeos. Embora as fases ciano e diol quimicamente ligadas à sílica sejam amplamente empregadas em CLAE-FN, suas aplicações em separações HILIC ainda são limitadas (JANDERA, 2011). Tanto os grupos ciano quanto os grupos diol são diretamente ligados à superfície da sílica através de um espaçador propila (IKEGAMI *et al.*, 2008). Os grupos ciano não promovem ligações de hidrogênio e são também menos hidrofílicos, ocasionando uma retenção insuficiente para a maioria dos compostos polares, restringindo seu uso a algumas aplicações especiais (JANDERA, 2011).

Devido aos grupos dihidroxilas serem mais hidrofílicos e possuírem maior capacidade de formação de ligação de hidrogênio, as fases diol têm sido mais aplicadas em separações do tipo HILIC do que as fases amida e ciano (IKEGAMI *et al.*, 2008). Os grupos diol podem ser ligados à sílica por meio de cadeias alifáticas mais longas (espaçadores), gerando uma fase estacionária menos hidrofílica e que resulta em menor retenção para compostos polares que as fases diol convencionais com espaçador propila (LIU; POHL, 2008).

Uma das principais vantagens das fases estacionárias neutras para aplicação no modo HILIC é o fato de atuarem preferencialmente em um único modo de eluição/separação, uma vez que a presença de cargas na superfície da fase estacionária leva a mecanismos mistos de separação devido a possível ocorrência de interação por processos de troca iônica, como no caso de fases estacionárias zwitteriônicas (GUO; GAIKI, 2005).

Essas fases estacionárias quimicamente ligadas, inicialmente, foram preparadas para cromatografia de fase reversa, em que se empregava fases móveis ricas em componente aquoso (IKEGAMI *et al.*, 2008; JANDERA, 2011). No entanto, a baixa retenção para solutos mais polares nestas fases fez com que seu uso fosse restringido a apenas substâncias fracamente polares (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Por outro lado, a maioria destas fases apresentaram comportamento HILIC, ou seja, os compostos altamente polares foram retidos fortemente quando empregaram-se eluentes com altas porcentagens de componente orgânico, tipicamente acima de 85%. Por este motivo, a ordem de eluição dos compostos é invertida nas fases HILIC se comparada a obtida em CLAE-FR.

No entanto, as fases quimicamente ligadas têm apresentado baixas eficiências e estabilidade a longo-prazo limitada (vida útil relativamente curta) (GUO; GAIKI, 2011). Este fato pode estar associado à modificação incompleta dos grupos hidroxilas da superfície da sílica que ficam expostos ao contato com substâncias principalmente básicas adsorvendo-as irreversivelmente (BUI; VERHAGE; IRGUM, 2010).

### 1.3.2 Fases estacionárias imobilizadas por polímeros

Uma alternativa para que os grupos silanóis reativos superficiais da sílica sejam mais bem protegidos, é o recobrimento dos mesmos com polímeros (COLLINS *et al.*, 2009). Fases estacionárias baseadas no recobrimento polimérico, principalmente na modalidade de fase reversa, possuem eficiências similares às fases quimicamente ligadas (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009). A pretensão é a formação de uma monocamada polimérica que englobe toda a superfície do suporte cromatográfico, protegendo os grupos silanóis e consequentemente, protegendo a sílica do contato com a fase móvel.

O objetivo de produzir fases estacionárias com polímeros recobertos sobre um suporte é combinar a resistência mecânica da matriz inorgânica com a seletividade e inércia química dos polímeros orgânicos (DIB; FARIA, 2014). As fases com polímeros apresentam vantagens em relação às quimicamente ligadas, como maior recobrimento dos sítios ativos do suporte e a possibilidade de maior seletividade da fase estacionária pela escolha adequada do polímero (JARDIM *et al.*, 2010). Outro fator a ser considerado é o econômico, pois o preço de um quilo dos polímeros é muito menor que poucos mililitros dos reagentes que promovem a ligação química. Além disso, a preparação de fases recobertas com polímeros não requer controle tão rigoroso das condições experimentais, como é necessário na reação da sílica com os reagentes que promovem a ligação química. Esta vantagem em especial, traz significativos benefícios quanto à obtenção de colunas cromatográficas de menor custo, haja vista que colunas comerciais para CLAE são reconhecidamente caras.

Devido a melhor proteção da superfície do suporte, as fases estacionárias com polímeros imobilizados são mais estáveis em uma faixa mais ampla de pH e a sílica estará mais bem protegida do ataque de fases móveis, sejam essas ácidas ou básicas.

A seletividade da fase estacionária imobilizada por polímero é diretamente influenciada pela quantidade de grupos funcionais nas cadeias dos polímeros, pela espessura do filme polimérico e pela área superficial e estrutura de poros do suporte (TONHI *et al.*, 2002). A ampla variedade de polímeros com distintas funcionalidades disponíveis comercialmente permite a aquisição de materiais de fases estacionárias com ampla faixa de seletividade, tornando possível o ajuste fino da seletividade ao problema analítico de separação (JARDIM *et al.*, 2010). Essa característica em especial foi de interesse para esse trabalho, pois visou-se a obtenção de uma camada polimérica com características mais polares que pudesse reter compostos polares de forma diferencial, separando-os quando presentes em misturas, desde as mais simples até as mais complexas.

Na preparação das fases estacionárias recobertas com polímeros é importante levar em consideração a quantidade de polímero imobilizado sobre o suporte. Espera-se que uma quantidade maior de polímero sorvido ao suporte cromatográfico forneça maior proteção dos grupos ativos (silanóis) presentes, porém grandes quantidades de polímero podem também resultar em uma camada orgânica mais espessa e bloquear os poros do suporte cromatográfico. Como consequência, a fase estacionária não terá bom desempenho cromatográfico devido ao lento transporte de massa dos analitos (BOTOLLI *et al.*, 2002). Portanto, é necessário alcançar duas propriedades na etapa de preparação das fases estacionárias: um filme fino que não bloqueie a entrada dos poros, resultando em rápida transferência de massa nos poros e no filme polimérico, e; uma camada polimérica uniforme, para recobrir completamente os sítios não específicos do suporte, para que não haja interações indesejáveis com o analito (FARIA; JARDIM; COLLINS, 2009).

A forma mais comum de recobrimento polimérico do suporte de sílica é realizada através da deposição de uma camada polimérica pré-sintetizada sobre a sua superfície. Neste caso, mistura-se o polímero pré-sintetizado em solução com o suporte, recobrimo-o apenas por mecanismos de adsorção e, posteriormente, evapora-se o solvente (JARDIM; COLLINS K; COLLINS C, 2004). Posteriormente ao recobrimento polimérico, se a sorção do polímero ao suporte for governada por interações fracas, pode-se imobilizar (proporcionar melhor “ancoragem”) o polímero no suporte, a fim de buscar camadas poliméricas mais estáveis e insolúveis em fases móveis. A imobilização de polímeros sobre um suporte poroso, como a sílica, é um processo complexo influenciado pela contribuição das diferentes interações entre o suporte e o polímero (TONHI *et al.*, 2002). Para o melhor recobrimento dos grupos silanóis na superfície da sílica, vários métodos de imobilização têm sido estudados, tais como: tratamento térmico (MALDANER; JARDIM, 2010; DIB; FARIA, 2014); imobilização via micro-ondas (LOPES *et al.*, 2004; CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016); imobilização via radiação gama (FARIA; COLLINS K; COLLINS C, 2007), etc. Esta etapa de imobilização proporciona uma maior vida útil das fases estacionárias, pois nesta etapa a energia (na forma de calor ou de radiação) aplicada no material diminui a viscosidade do polímero permitindo uma melhor conformação sobre a superfície das partículas da sílica, produzindo uma fina camada polimérica que “encapsula” o suporte (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

### 1.3.2.1 Imobilização polimérica por tratamento térmico

O tratamento térmico é uma fonte de energia amplamente utilizada, no qual o aquecimento ocorre por condução de calor, isto é, o recipiente contendo o material de suporte cromatográfico e o polímero é aquecido e, em seguida, ocorre a transferência de calor para a amostra. O tratamento térmico é utilizado para acelerar a imobilização do polímero no suporte de sílica, auxiliando no processo de auto-imobilização (BOTTOLI *et al.*, 2004). A auto-imobilização é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário considerável período de tempo para que as moléculas do polímero se rearranjem de maneira a formarem uma camada estável e uniforme sobre a superfície do suporte cromatográfico. O período de tempo para que ocorra a imobilização de forma irreversível depende do tipo de material a ser utilizado como suporte cromatográfico e do tipo de polímero (BOTTOLI, 2002).

As principais vantagens da imobilização térmica é a sua simplicidade e facilidade de emprego, uma vez que necessita apenas de um forno com controle de temperatura, como uma estufa, para a realização do procedimento. As temperaturas e o tempo de imobilização térmica são as principais variáveis a serem estudadas, sendo o tempo mínimo necessário normalmente superior a 10 h (BOTTOLI *et al.*, 2002; VIGNA, 2004).

### 1.3.2.2 Imobilização polimérica via radiação gama

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear, altamente energética, que lhe confere um grande poder de penetração e uma alta capacidade de interação com espécies atômicas ou moleculares (SWALLOW, 1973). As fontes de radiação gama mais acessíveis comercialmente são as que contêm radionuclídeos cério-137 e cobalto-60. A fonte de cobalto-60 é a mais utilizada e a preferida por liberar raios gama com maior energia (TONHI, 2004).

Quando a radiação gama incide na matéria, ocorrem processos tais como excitação eletrônica e ionização. As moléculas excitadas ou ionizadas podem sofrer cisões ou reagirem com outras espécies, produzindo novas espécies químicas. Em polímeros, a radiação provoca a degradação, resultando na diminuição da cadeia polimérica, devido a reações químicas que envolvem cisões e, no entrecruzamento, quando as cadeias poliméricas são ligadas umas às outras, resultando em estruturas de alta massa molar. A degradação e o entrecruzamento podem ocorrer simultaneamente, portanto, a estrutura final do polímero é determinada pelo processo que ocorrer em maior extensão (JARDIM; COLLINS; ANAZAWA, 1999; FARIA, 2006). No entanto, a disponibilidade de fontes de radiação e o longo período de tempo requerido para

promover a imobilização de polímeros orgânicos sobre suportes inorgânicos são os principais inconvenientes deste método de imobilização (FARIA; COLLINS K; COLLINS C, 2007).

#### *1.3.2.3 Imobilização polimérica via irradiação micro-ondas*

A radiação micro-ondas é bastante aplicada em química analítica. As principais aplicações das micro-ondas estão na digestão de amostras para análise elementar, na extração de diversas espécies químicas e na dessorção térmica de vários compostos de matrizes diversas (SANSEVERINO, 2002).

A micro-onda é um tipo de energia não ionizante, insuficiente para romper ligações químicas. Possui frequência que vai de 300 a 300.000 MHz e que correspondem a comprimentos de onda no intervalo de 1 mm a 1 m (SANSEVERINO, 2002). A ação da radiação micro-ondas baseia-se na transformação da energia eletromagnética em calor através da rotação dipolar e da condução iônica. A rotação dipolar está relacionada com o alinhamento das moléculas, que possuem dipolos permanentes ou induzidos com o campo elétrico aplicado. Quando se retira o campo, as moléculas voltam ao estado desordenado e a energia que foi absorvida para a orientação dos dipolos é dissipada na forma de calor. Um forno micro-ondas convencional com frequência de 2,45 GHz, oscila  $5,0 \times 10^9$  vezes por segundo, provocando um aquecimento extremamente rápido (TONHI, 2004). A eficiência do aquecimento por rotação dipolar depende da viscosidade da amostra e da temperatura.

No mecanismo de condução iônica, a transformação de energia eletromagnética em calor ocorre a partir da migração condutiva (eletroforética) de íons dissolvidos sob ação de um campo eletromagnético. Os íons se movimentam provocando um fluxo de corrente que sofre certa resistência devido a outras espécies com fluxo oposto ao movimento. Com a resistência há a produção de calor, provocando um aumento da temperatura do meio e que, conseqüentemente, aquece a amostra. No aquecimento, a taxa de contribuição dos mecanismos depende da mobilidade e da concentração dos íons (BEGNINI; JARDIM, 2013).

### **1.4 Seletividade da fase estacionária baseada em poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano)**

Em CLAE-FR, os polissiloxanos são os polímeros mais empregados no recobrimento do suporte cromatográfico por possuírem características muito parecidas com as de moléculas individuais de organossilanos e se comportarem como líquidos retidos na superfície da sílica (JARDIM *et al.*, 2004). Fases estacionárias baseadas no reagente organossilano C<sub>18</sub> foram as

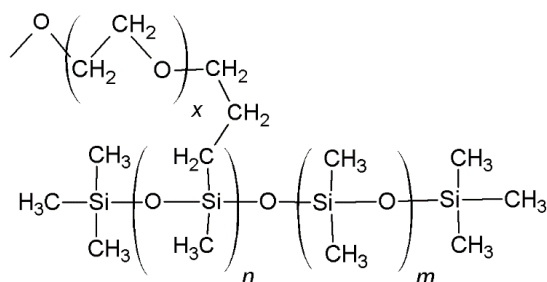
primeiras a serem preparadas para CLAE-FR devido à ampla disponibilidade do reagente, em virtude de sua utilização no processo de silanização de vidro (KIRKLAND, 2004). Porém, a desvantagem dessas fases é que somente um número limitado de grupos silanóis (grupos ativos da superfície da sílica, Si-OH) reage devido ao impedimento estérico (KIRKLAND, 2004; ENGELHARDT; BLAY; SAAR, 2005). O impedimento estérico é gerado pelos volumosos agentes silanos (C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>) empregados na reação, que ocasionam a baixa concentração do ligante na superfície da sílica. Os silanóis que não reagem (silanóis residuais) são ácidos e podem alterar o mecanismo de retenção, contribuindo para a retenção e desempenho indesejados, principalmente, de substâncias polares e básicas (KIRKLAND, 2004; ENGELHARDT; BLAY; SAAR, 2005).

Os polissiloxanos apresentam ótima estabilidade térmica, resistência química e mecânica; e sua seletividade, é função dos grupos substituintes existentes em suas estruturas (VIGNA, 2004). Atualmente, novos polímeros com seletividades diferenciadas têm sido o objeto de pesquisas para que as colunas cromatográficas atendam, cada vez mais, problemas analíticos específicos e complexos, possibilitando a realização de separações cromatográficas de forma simples e rápida (JARDIM *et al.*, 2010).

Um grande número de polímeros já foi empregado no preparo de fases estacionárias recobertas em CLAE-FR, dentre estes se destacam: poli(dimetilsiloxano) - PDMS (BORGES; EUERBY; COLLINS, 2012) (TONHI; COLLINS, K; COLLINS, C, 2005); poli(metiltetradecilsiloxano) - PMTDS (FARIA; COLLINS K; COLLINS C, 2007) poli(metiloctadecilsiloxano) - PMODS (SILVA; COLLINS, 2012). Fases estacionárias baseadas no recobrimento com o poli(dimetil-*co*-alquilmetilsiloxano) – PDAS, sobre partículas de sílica (CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016) obtiveram bom desempenho cromatográfico, como consequência do eficiente recobrimento dos grupos silanóis fornecido pelo polímero.

Considerando que a tecnologia de preparo de fases estacionárias recobertas e imobilizadas por polímeros já é bem estabelecida em CLAE-FR, porém ainda não foi bem explorada para aplicações em separações de compostos polares, neste trabalho buscou-se a preparação de uma nova geração de fases estacionárias para CLAE, com potencialidade de separação de compostos polares, que se baseia na imobilização térmica de um polímero com característica polar, o poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) (PEO), sobre partículas de sílica. A estrutura monomérica do PEO está apresentada na Figura 4.

Figura 4. Estrutura monomérica do polímero poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano).



O poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (PEO) é um copolímero em bloco: um bloco de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), que está presente na estrutura para garantir as propriedades de imobilização do polímero no suporte inorgânico; e um bloco de poli(óxido de etileno) (PEO) para garantir uma retenção mais fraca de compostos apolares e maior interação com substâncias polares, e assim, promover a separação de misturas que apresentam dificuldades de serem analisadas em fases estacionárias disponíveis comercialmente (SPITZER; SABADINI; LOW, 2002).

Portanto, o emprego do poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) no preparo de fases estacionárias de interação hidrofílica torna o material interessante para a separação de substâncias (compostos polares) que não são bem resolvidas em CLAE-FR, por ser um polissiloxano, se comportando como líquido retido na superfície da sílica, e também, por possuir grupamento polar (éter) em sua estrutura, o que lhe confere comportamento polar (hidrofílico) e é também responsável pela seletividade.

### 1.5 Caracterização cromatográfica de fase estacionária

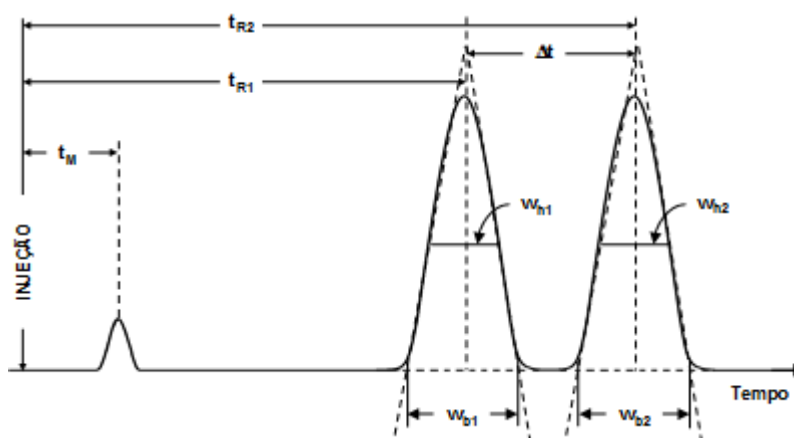
A busca cada vez maior de materiais que apresentem bom desempenho cromatográfico em determinadas separações, levou a introdução de uma grande quantidade de diferentes materiais a serem utilizados como fase estacionária. Muitas dessas fases estacionárias disponíveis apresentam denominações e propriedades, aparentemente iguais, o que dificulta a escolha de um material para determinada separação. Diante disso, faz-se necessária a caracterização completa de uma fase estacionária, a fim de que características específicas de cada material sejam determinadas. Alguns métodos físico-químicos, termogravimétricos e espectroscópicos são utilizados na caracterização, porém são métodos que necessitam do desempacotamento da coluna cromatográfica (destruição do leito cromatográfico) e que não retratam de forma realística a capacidade de separação dos materiais. Uma boa alternativa é o emprego de testes

cromatográficos que avaliem as características, a qualidade e a viabilidade analítica das fases de acordo com as interações do analito com a fase estacionária e a fase móvel, sem que ocorra a destruição da coluna (KRUPCZYNSKA; BUSZEWSKI; JANDERA, 2004).

Quando uma coluna cromatográfica é adquirida, seja comercial ou recheada no próprio laboratório, é necessário e desejável realizar cálculos dos parâmetros cromatográficos, com o intuito de avaliar o potencial dessa coluna na aplicação de separações cromatográficas futuras. Estes cálculos cromatográficos são realizados a partir da separação de misturas testes padrão de protocolos já bem estabelecidos em cromatografia líquida de alta eficiência. Estes protocolos são simples e permitem a comparação das características entre fases estacionárias, bem como o detalhamento de propriedades de retenção e seletividade das mesmas.

O cromatograma da separação de uma mistura teste, contendo compostos padrões, fornece informações a respeito do desempenho e eficiência de uma coluna cromatográfica. Na Figura 5, estão apresentados alguns parâmetros cromatográficos que são calculados a partir de picos referentes à compostos padrões obtidos em um cromatograma.

Figura 5. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação de parâmetros cromatográficos.



Em que:  $w_b$  é a largura do pico na linha de base;  $w_h$  é a largura do pico à meia altura;  $t_M$  é o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária, ou seja, é o tempo gasto pela fase móvel para percorrer a coluna cromatográfica até a cela do detector;  $t_R$  é o tempo de retenção do composto, isto é, o tempo que o composto leva para percorrer o sistema cromatográfico desde o momento de sua injeção até o registro do máximo de seu pico.

O tempo de retenção do analito ( $t_R$ ) e o tempo de retenção de um composto não retido ( $t_M$ ), são obtidos diretamente do cromatograma. O tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) é o tempo real que as moléculas ou íons do analito ficam retidos na fase estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), calculado pela Equação 1.

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Equação 1}$$

Fator de retenção (k) é calculado pela razão dos tempos em que o soluto fica retido na fase estacionária e que caminha junto com a fase móvel, de acordo com a Equação 2.

$$k = t'_R / t_M \quad \text{Equação 2}$$

Valores ideais para o fator de retenção devem compreender o intervalo entre 1 a 10. Se os valores de k são muito baixos, o grau de separação pode ser inadequado, valores de k muito altos resultam em tempos de análises muito longos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

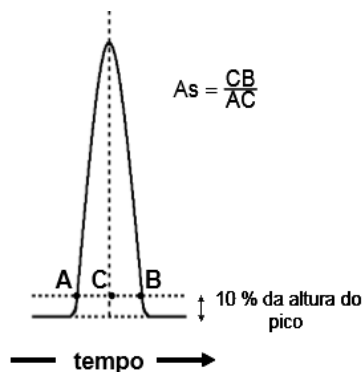
Resolução ( $R_s$ ) entre picos é o parâmetro que indica se ocorreu ou não uma boa separação entre picos adjacentes. É definida pela razão da distância entre os máximos dos dois picos, a distância entre os dois tempos de retenção, e a média aritmética das larguras à linha de base dos dois picos. Este parâmetro pode ser determinado a partir da Equação 3.

$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,77 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Quando a  $R_s = 1$ , os picos não estão completamente separados, mas é possível observar a presença de dois componentes. Maiores valores de resolução indicam melhor separação: resolução igual a 1,25 representa uma separação suficiente para fins quantitativos; resolução com valores maiores que 1,5 indica separação completa de dois compostos adjacentes, sem nenhuma superposição dos picos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O fator de assimetria ( $A_{s\ 10\%}$ ) é calculado a partir da razão da distância horizontal do ponto central até o fim do pico (CB) pela distância horizontal do início até o ponto central do pico (AC), de acordo com a Figura 6. Esta medida é realizada a 10 % da altura do pico, devido problemas de estabilidade da linha de base.

Figura 6. Medida do fator de assimetria do pico.



Os valores do fator de assimetria ( $As_{10\%}$ ) devem estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitidos valores de até 1,6 (SNYDER; KIRKLAND, 1997).

O número de pratos ( $N$ ) é o parâmetro relacionado com a eficiência da coluna cromatográfica. Um prato, é o resultado de uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, significa que existem várias etapas de equilíbrios, e conseqüentemente, melhor separação e eficiência. Normalmente, a eficiência de uma coluna usada em CLAE é expressa em número de pratos por metro ( $N/m$ ), pois, desta forma é possível comparar a eficiência cromatográfica de colunas de diferentes comprimentos. Este parâmetro é determinado pela Equação 4.

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

De acordo com a Equação 4, quanto mais estreito for o pico cromatográfico maior será a eficiência de uma coluna cromatográfica. Alguns fatores, como por exemplo, tamanho e uniformidade das partículas do material de recheio, condições de enchimento da coluna, comprimento da coluna, entre outros, podem alterar o número de pratos de uma coluna. A avaliação comparativa entre duas colunas cromatográficas também pode ser feita usando a medida da altura de prato ( $H$ ), calculado pela Equação 5 a partir das informações do comprimento da coluna ( $L$ ) e do número de pratos ( $N$ ) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

$$H = L / N \quad \text{Equação 5}$$

### 1.5.1 Mistura Hidrofóbica

A mistura hidrofóbica é constituída de compostos neutros de polaridades variadas: uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. A uracila é adicionada à mistura para a obtenção do  $t_M$ , essencial para o cálculo dos parâmetros cromatográficos. O  $t_M$  é o tempo necessário para que a fase móvel passe através de toda a extensão do sistema cromatográfico, desde o momento da injeção até o registro do máximo do pico da uracila pelo sistema de detecção.

### 1.5.2 Mistura teste de Tanaka e colaboradores

O protocolo desenvolvido por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989) é o mais empregado para caracterização de preparações de fases estacionárias no modo de fase reversa quanto às suas propriedades de retenção. É o protocolo mais completo de caracterização, sendo empregado tanto por empresas quanto no meio acadêmico.

No protocolo proposto por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989), as propriedades das fases estacionárias avaliadas são:

- Hidrofobicidade ( $k_{PB}$ ) – Medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno na mistura A. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da camada orgânica da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento da superfície da fase estacionária.
- Seletividade hidrofóbica ( $\alpha_{CH_2}$ ) – Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno,  $\alpha_{CH_2} = k_{PB}/k_{BB}$ . Esta é uma medida da capacidade da fase em diferenciar compostos orgânicos durante a separação, pois a seletividade hidrofóbica mede o grau de separação de alquilbenzenos distintos por um grupo  $CH_2$ .
- Seletividade estérica ( $\alpha_{T/O}$ ) – Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila,  $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$ . O  $\alpha_{T/O}$  mede a capacidade da fase estacionária em separar duas substâncias com estruturas químicas similares, porém que diferem quanto à sua geometria e disposição espacial.
- Capacidade de ligação de hidrogênio ( $\alpha_{C/P}$ ) – Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol,  $\alpha_{C/P} = k_C/k_P$ . O  $\alpha_{C/P}$  é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis na fase estacionária que estão aptos a formarem ligações de hidrogênio com componentes da amostra.
- Capacidade de troca iônica total ( $\alpha_{B/P\ pH\ 7,60}$ ) – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol,  $\alpha_{B/P\ pH\ 7,60} = k_B/k_P$ , empregando fase móvel

tamponada em pH 7,60. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da fase estacionária.

- Capacidade de troca iônica em meio ácido ( $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$ ) – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol,  $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70} = k_B/k_P$ , empregando fase móvel tamponada em pH 2,70. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária.

## 1.6 Planejamento e otimização de experimentos

As técnicas de planejamento de experimentos são bastante usadas em etapas preliminares na inspeção de diferentes problemas em diversos setores de pesquisa, desenvolvimento e produção. Nessas etapas, muitas vezes, torna-se necessário analisar a influência de um ou mais fatores que podem afetar o resultado de forma positiva ou negativa.

O planejamento fatorial permite determinar a influência de todas as variáveis experimentais. No planejamento fatorial completo, os experimentos devem ser realizados em todas as possíveis combinações dos níveis de variáveis, ou seja, para  $k$  variáveis investigadas em dois níveis cada, serão necessários pelo menos  $2^k$  experimentos. Exemplificando: na otimização de um procedimento que contém 4 variáveis, teremos que realizar, no mínimo, 16 experimentos.

Considerando que nem todas as variáveis são igualmente importantes com respeito ao seu efeito sobre a resposta, deve-se selecionar as variáveis que farão parte da busca da otimização. No planejamento fatorial completo o número de ensaios cresce a cada variável adicionada, tornando sua utilização inviável, pois o número de experimentos também torna-se muito grande e o trabalho para realizar fica complexo. Por exemplo, para  $k = 8$  temos:  $2^8 = 256$  experimentos, sendo cada vez maior o número de experimentos a medida que o valor de  $k$  cresce. Nestes casos, deve-se usar o planejamento fatorial fracionário, semelhante ao fatorial completo, que permite o estudo de um grande número de fatores realizando apenas um número limitado de experimentos sem perder as informações de interesse. São empregados dois níveis e o número de experimentos é dado por  $2^{k-1}$  (LUNDSTEDT *et al.* 1998).

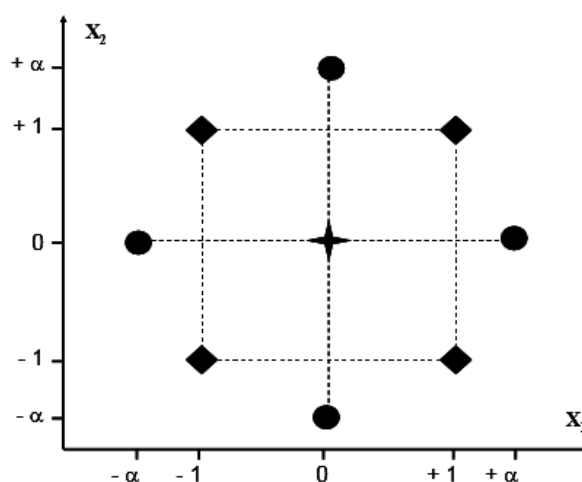
Em química analítica, a determinação de variáveis que influenciam nos resultados é apenas uma etapa do procedimento. É necessária a otimização do procedimento experimental, buscando minimizar o trabalho necessário, seja para a redução de tempo ou de gastos, entre outros. Uma excelente ferramenta para otimização de um procedimento analítico é a utilização de metodologia de superfície de resposta, empregando funções polinomiais. Estas funções polinomiais possuem termos quadráticos que permitem a observação do ponto máximo, em

diferentes superfícies gráficas. A metodologia de superfícies de respostas é uma boa forma de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas. Para ajustar os dados experimentais a um modelo quadrático, aplica-se o planejamento composto central (LUNDSTEDT *et al.* 1998). Este planejamento é dividido em três partes:

- Planejamento fatorial completo ou fracionário, para determinação dos fatores que influenciam significativamente os resultados;
- Experimentos no ponto central. O ponto central é a condição intermediária aos níveis de todos os fatores estudados;
- Planejamento axial (ou estrela), que são experimentos realizados em pontos axiais, com distância  $\pm \alpha$  da origem.

A Figura 7, apresenta um sistema de coordenadas para cada etapa do planejamento composto central.

Figura 7. Planejamento composto central para duas variáveis: ( $\diamond$ ) planejamento fatorial  $2^2$ , (+) ponto central e ( $\bullet$ ) planejamento axial.



Quando os experimentos são realizados de forma aleatória, espera-se que os resultados também sejam obtidos de forma aleatória. Por isso, faz-se necessário o planejamento de experimentos para que a informação de interesse possa ser obtida. No trabalho, o planejamento e a otimização de experimentos são ferramentas utilizadas para examinar sistematicamente as variáveis que podem influenciar o resultado (desempenho cromatográfico da fase estacionária) de forma positiva ou negativa.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento e otimização de uma fase estacionária com características de interação hidrofílica baseada na imobilização térmica do polímero poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) (PEO) na superfície de partículas de sílica, visando obter um material capaz de separar substâncias polares com alta eficiência, sem gerar grandes volumes de resíduos orgânicos de fase móvel. Como objetivos secundários, buscou-se otimizar as condições de preparo das fases estacionárias, para obtenção de materiais com recobrimento polimérico eficiente do suporte cromatográfico e caracterizar cromatográfica e físico-quimicamente os materiais produzidos, por meio de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e microscópicas.

Para alcançar estes objetivos, algumas etapas foram executadas:

- Preparação das fases estacionárias, empregando o método de evaporação estática do solvente e o tratamento térmico para a imobilização do PEO sobre as partículas de sílica;
- Otimização das condições de imobilização das fases estacionárias para a obtenção de colunas com bom desempenho cromatográfico, empregando um planejamento composto central;
- Enchimento das colunas de aço inoxidável de 50 mm × 4,0 mm de d.i. com as fases estacionárias preparadas;
- Avaliação do desempenho cromatográfico das fases estacionárias através da separação de misturas-teste padrão;
- Caracterização físico-química das propriedades dos materiais produzidos;
- Aplicação da fase estacionária Si(PEO) otimizada na separação de misturas de compostos polares.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Equipamentos

- Analisador elementar, PerkinElmer, modelo 2400 (Norwalk, CT, EUA).
- Analisador termogravimétrico modelo DTG-60H, marca Shimadzu (Quioto, Japão).
- Cromatógrafo a líquido com sistema binário de bombeamento da marca Varian (Palo Alto, CA, EUA), modelo ProStar® 210 com detecção UV/vis e sistema de injeção manual Reodhyne®, sistema de aquisição de dados Galaxie®.
- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão).
- Microscópio eletrônico de varredura TESCAN (Tóquio, Japão).

#### 3.2 Reagentes e solventes

- Água ultrapurificada a 18,3  $\Omega$  cm.
- Benzilamina 99 % (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil).
- Butilbenzeno 99,5 % (Sigma Aldrich).
- Cafeína 98 % (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Clorofórmio grau espectroscópico, 99 % (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil).
- Etilbenzeno 99,5 % (Sigma Aldrich).
- Fenol 99,5 % (Vetec).
- Hexano, (Tedia).
- Metanol grau HPLC, 99,5 % (Tedia).
- *O*-terfenila 99 % (Sigma Aldrich).
- Pentilbenzeno 99 % (Sigma Aldrich).
- Poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (PEO); 75% poli(óxido de etileno), 25% poli(dimetilsiloxano); (UCT Specialties, Bristol, CT, EUA).
- Sílica cromatográfica Chromosorb, partículas de 5  $\mu$ m de diâmetro (Varian, Palo Alto, CA, EUA).
- Tolueno grau espectroscópico (Tedia).
- Trifenileno 98 % (Sigma Aldrich).
- Uracila 99 % (Sigma Aldrich).

### **3.3 Agrotóxicos e fármacos**

#### **3.3.1 Agrotóxicos**

- 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), padrão analítico, Pestanal ®, 97,0%. Número CAS 94-75-7;
- Captana, padrão analítico, Pestanal ®, 93,0%. Número CAS 133-06-2;
- Carboxina, padrão analítico, Pestanal ®, 95,0%. Número CAS 5234-68-4;
- Clorpirifós, padrão analítico, Pestanal ®, 97,0%. Número CAS 2921-88-2;
- Diuron, padrão analítico, Pestanal ®, 98,0%. Número CAS 330-54-1;
- Metomil, padrão analítico, Pestanal ®, 98,6%. Número CAS 16752-77-5;
- Terbutilazina, padrão analítico, Pestanal ®, 99,0%. Número CAS 5915-41-3;
- Tiofanato metílico, padrão analítico, Pestanal ®, 96,6%. Número CAS 23564-05-8.

#### **3.3.2 Fármacos**

- Cafeína 98 % (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).
- Diclofenaco de sódio, número CAS 15307-79-6, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Paracetamol, número CAS 103-90-2, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.

### **3.4 Preparação das fases estacionárias**

#### **3.4.1 Ativação da sílica cromatográfica**

Inicialmente, realizou-se a ativação da sílica cromatográfica com o objetivo de remover as moléculas de água adsorvidas na superfície do suporte. Foram pesados aproximadamente 10 g de sílica de partículas de 5 µm de diâmetro em um béquer, e este foi deixado na estufa por uma noite à temperatura de 140° C. Em seguida, colocou-se o béquer devidamente fechado com papel alumínio em um dessecador, sob vácuo, até que fosse atingida a temperatura ambiente (~10 min).

### ***3.4.2 Sorção do poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) sobre sílica***

A sorção do polímero, poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) – PEO, sobre a sílica foi realizada a partir do método por evaporação estática do solvente (JARDIM; COLLINS K; COLLINS C, 2004). Foram preparados materiais com diferentes condições de solvente (hexano ou clorofórmio) e carga polimérica (25 e 50 % do polímero PEO). Inicialmente, foi preparada uma solução do polímero 50% m/v em clorofórmio. Em seguida, em um béquer de 50 mL, foram adicionados 1,000 g de sílica e 20 mL de solvente e, lentamente, foi adicionada a quantidade adequada da solução do PEO a 50 % m/v em clorofórmio (com carga de 25 ou 50 % m/m do polímero em clorofórmio, massa de polímero em relação à massa do suporte). A mistura foi submetida à agitação magnética por 10 min sem que houvesse agitação vigorosa, evitando a perda da solução. O béquer foi retirado do agitador magnético e deixado em banho ultrassom por 5 min. Posteriormente, o material foi deixado novamente sob agitação magnética por 2 h e 30 min. Após esse período, o béquer foi retirado da agitação, protegido com papel alumínio com furos e levado à capela para a secagem do solvente à temperatura ambiente. O béquer permaneceu na estufa para a total evaporação estática do solvente, por aproximadamente cinco dias.

### ***3.4.3 Imobilização do polímero sobre a sílica***

Com o material seco obtido, iniciou-se a etapa de imobilização térmica do polímero sobre as partículas de sílica. Esta etapa é fundamental no processo de preparo da fase estacionária, pois aumenta a intensidade da interação do polímero com o suporte, evitando a sua lixiviação com a passagem contínua de fase móvel. O material foi submetido ao aquecimento, sob diferentes condições de temperatura e de tempo.

Para otimizar o processo de preparo das fases estacionárias Si(PEO) sob diferentes condições, verificando quais variáveis podem influenciar significativamente nos resultados de forma negativa ou positiva, foi utilizado o planejamento e otimização de experimentos.

As etapas do planejamento experimental foram:

- Planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , para seleção das variáveis (fatores) que afetam a incorporação do PEO sobre a sílica, no preparo da fase Si(PEO);
- Planejamento composto central  $2^2$ , para determinação das condições ótimas das variáveis que afetam a imobilização do PEO sobre a sílica.

As variáveis e os níveis estudados pelo planejamento estão apresentados na Tabela 1. Os níveis foram escolhidos a partir de experimentos prévios, como por exemplo, a análise termogravimétrica do polímero e sua solubilidade em diferentes solventes.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados para a otimização do preparo de fases Si(PEO).

	Variáveis	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
1	Solvente	Hexano	Clorofórmio
2	Temperatura de imobilização (°C)	100	150
3	Tempo de imobilização (min)	8	16
4	Carga polimérica de PEO (% m/m)	25	50

O planejamento fatorial fracionário permitiu o estudo de quatro variáveis realizando apenas um número limitado de experimentos, oito, sem perder informações de interesse (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). Na Tabela 2 estão apresentadas as diferentes condições de preparo das fases estacionárias avaliadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  para as diferentes condições de preparo da fase Si(PEO). Variáveis: 1- solvente, 2- temperatura, 3- tempo e 4- carga de PEO.

Experimento	Variáveis			
	1	2	3	4
1	+	+	+	+
2	+	–	–	+
3	–	+	–	+
4	+	+	–	–
5	–	–	+	+
6	+	–	+	–
7	–	+	+	–
8	–	–	–	–

#### 3.4.4 Extração do polímero não imobilizado

Após a etapa de imobilização do polímero ao suporte de sílica sob as diferentes condições, as fases estacionárias foram submetidas a etapas de lavagens sequenciais com 5 mL de clorofórmio, 5 mL de metanol e 5 mL de metanol:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), para a remoção dos resíduos

dos reagentes e do PEO que não foi imobilizado na sílica. Nesta etapa, pequenas quantidades da fase estacionária seca e imobilizada, foram divididas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados os solventes, e em seguida, a mistura foi agitada em vórtex e submetida à centrifugação por 2 min a 2500 r.p.m. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, o material sólido foi levado à estufa e seco a 70 °C.

### **3.5 Enchimento das colunas cromatográficas**

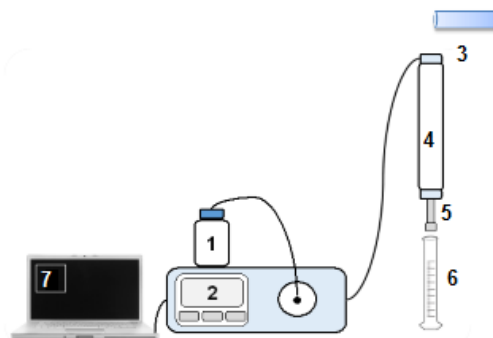
#### ***3.5.1 Suspensão da fase estacionária***

As colunas cromatográficas foram preenchidas com as fases Si(PEO) pelo método do enchimento por suspensão a alta pressão (MEYER, 2010). Para o enchimento da coluna, foi preparada uma suspensão da fase Si(PEO) em clorofórmio a 5 % (m/v) em tubo de ensaio rosqueável. O clorofórmio foi utilizado por ser um solvente de densidade e viscosidade apropriadas para o posterior recheio da coluna cromatográfica. O tubo foi deixado em agitação por 12 h, com auxílio de um agitador e uma barra magnética. Esta etapa é realizada a fim de prevenir o recheio da coluna cromatográfica de forma irregular, evitando que partículas maiores sejam depositadas preferencialmente a partículas menores, o que poderia resultar em uma variação da pressão na coluna durante a separação cromatográfica.

#### ***3.5.2 Enchimento da coluna com a suspensão da fase estacionária***

Para a avaliação das fases estacionárias preparadas, foram empregados tubos de aço inoxidável de formato cilíndrico com 50 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno. Após preparada a suspensão da fase estacionária Si(PEO) em clorofórmio, as colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o método à alta pressão, de acordo com o esquema apresentado na Figura 8.

Figura 8. Representação esquemática do sistema de enchimento e esvaziamento de colunas cromatográficas.



Conforme ilustrado na Figura 8, o reservatório do solvente propulsor (1) foi preenchido com metanol. A pressão da bomba (2) foi ajustada para 9.000 psi. Ao reservatório de suspensão (4) contendo a coluna cromatográfica (50 x 4,0 mm d.i) (5) devidamente acoplada à sua extremidade foi adicionada a suspensão da FE contida no tubo de ensaio (3). O volume do reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio). A extremidade superior do reservatório de solvente foi fechada. Com o sistema todo fechado, a bomba foi ligada propulsionando o solvente (metanol) para o reservatório de suspensão que levou a suspensão da FE para o interior da coluna, ficando retida devido à presença de um filtro na extremidade inferior da coluna. O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de 80 mL de solvente (6), que foi recolhido em uma proveta de 100 mL, colocada logo abaixo do sistema de enchimento. Esse volume é equivalente a duas vezes a capacidade do reservatório da suspensão. Após o término do enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal.

### 3.5.3 Condicionamento das colunas cromatográficas

A coluna cromatográfica previamente recheada com a fase Si(PEO) foi conectada ao cromatógrafo a líquido, passando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 50:50 (v/v) e vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, por cerca de 60 min. Nessa etapa apenas uma das extremidades da coluna foi acoplada ao cromatógrafo. A coluna foi conectada apenas à bomba cromatográfica e não ao detector, pois resíduos provenientes do enchimento poderiam ser removidos da coluna durante esta etapa, levando a cela de detecção espectrofotométrica ao entupimento.

### 3.6 Preparação da fase móvel

Os solventes constituintes das fases móveis empregadas neste trabalho foram volumetricamente medidos e filtrados, individualmente, utilizando-se de um sistema de filtração de fase móvel e uma membrana de Nylon de 47 mm de diâmetro e 0,22  $\mu\text{m}$  de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados em frascos separados e deixados por 5 min em banho ultrassom, para serem desgaseificados. Após desgaseificados, os solventes foram dispostos nos reservatórios para fase móvel do sistema cromatográfico.

### 3.7 Caracterização físico-química do polímero PEO

#### 3.7.1 *Análise termogravimétrica*

A estabilidade térmica do polímero PEO foi avaliada por análise termogravimétrica, na qual cerca de 5 mg de amostra foram colocados em uma microbalança no analisador térmico e submetidos a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . As medidas foram realizadas sob atmosfera inerte em um analisador termogravimétrico modelo DTG-60H, marca Shimadzu (Quioto, Japão), no qual foi medida a percentagem de perda de massa da amostra de acordo com o aumento da temperatura. Essa medida foi realizada no laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.7.2 *Cromatografia de permeação em gel*

A cromatografia por exclusão, na modalidade de permeação em gel, foi empregada para avaliar as características do polímero PEO, fornecendo informações sobre a distribuição da massa molar e o índice de polidispersividade. Foi utilizada uma coluna da American Polymer Standard Corporation® para separação de substâncias de 1.000 a 20.000 Da., com dimensões de 300 mm de comprimento por 7,8 mm de diâmetro interno. Para construção da curva analítica foram empregados padrões de poliestireno de massas molares  $5,0 \times 10^2$ ;  $2,6 \times 10^3$ ;  $6,4 \times 10^3$ ;  $1,8 \times 10^4$  e  $4,3 \times 10^4$  dissolvidos em tetraidrofurano. Foram injetados 250  $\mu\text{L}$  de cada padrão, empregando como fase móvel tetraidrofurano a uma vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e uma temperatura de 40 °C para a coluna e para o detector por índice de refração. Para a avaliação do PEO, as amostras foram

preparadas a partir da dissolução do polímero em tetraidrofurano à 0,5 % (v/v). Esta medida foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

### ***3.7.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho***

O polímero poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) foi caracterizado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. A análise do material foi realizada por meio de pastilhas de KBr na proporção de 1:10 na região espectral 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão).

## **3.8 Caracterização físico-química das fases Si(PEO)**

### ***3.8.1 Microscopia eletrônica de varredura***

A avaliação morfológica das partículas de sílica imobilizadas com o PEO foi realizada por meio das micrografias desse material, obtidas a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesta técnica, as partículas foram fixadas em porta-amstras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. Os porta-amstras foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura TESCAN (Tóquio, Japão) com microsonda de raios-X. As imagens das partículas de Si(PEO) foram obtidas com diferentes ampliações. Essa medida foi realizada no laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

### ***3.8.2 Análise termogravimétrica***

A estabilidade térmica da fase estacionária Si(PEO) foi avaliada empregando análises termogravimétricas de acordo com o procedimento descrito no item 3.7.1.

### **3.8.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho**

A fase estacionária Si(PEO) foi caracterizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho a fim de identificar os principais grupos funcionais do PEO no material, confirmando a sua imobilização nas partículas de sílica. A análise do material foi realizada por meio de pastilhas de KBr na proporção de 1:10 na região espectral 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão).

### **3.8.4 Análise Elementar**

As fases Si(PEO) preparadas em diferentes condições foram submetidas à análise elementar para a determinação da porcentagem de carbono, tornando possível avaliar o grau de recobrimento da superfície do suporte cromatográfico pelo polímero, PEO. O método consiste na combustão do material seco, convertendo os elementos da amostra em gases simples, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ . Estes gases são submetidos a condições exatas de pressão, temperatura e volume. Posteriormente, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Foi empregado um analisador elementar PerkinElmer, modelo 2400 (Norwalk, CT, EUA). Essa medida foi realizada no laboratório multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

## **3.9 Caracterização cromatográfica das fases Si(PEO)**

As colunas recheadas com as fases estacionárias preparadas em diferentes condições foram avaliadas cromatograficamente através da determinação de parâmetros cromatográficos de compostos separados de misturas testes padrão. As misturas testes tratam-se de protocolos bem estabelecidos e conhecidos na literatura que são comumente empregados por diversos cromatografistas na avaliação do desempenho cromatográfico de fases estacionárias comerciais ou produzidos no próprio laboratório (KIMATA *et al.*, 1989; CRUZ *et al.*, 1997).

### **3.9.1 Mistura hidrofóbica**

A mistura hidrofóbica é composta por uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. A mistura foi utilizada para avaliar a seletividade e hidrofobicidade das fases estacionárias na

separação de compostos com polaridades diferentes. As condições de análise empregadas foram: fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50, v/v; vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm; volume de injeção de 20 µL. As condições de proporção dos solventes da fase móvel foram alteradas conforme a necessidade para se obter a melhor resolução dos picos no cromatograma.

### **3.9.2 Mistura teste de Tanaka e colaboradores**

Neste trabalho, esse protocolo foi empregado com o intuito de verificar se as fases Si(PEO) possuem características de cromatografia líquida de interação hidrofílica, visto que, é um teste específico para avaliar fases na modalidade reversa.

O protocolo é constituído de quatro misturas testes, cada uma com composição de fase móvel específica e que avalia diferentes características das fases estacionárias. Todas as misturas foram analisadas empregando uma vazão de fase móvel de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 µL. As misturas e suas respectivas fases móveis são:

- Mistura A: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenilo e trifenileno. Composição da fase móvel: MeOH: H<sub>2</sub>O, 80:20 (v/v).
- Mistura B: uracila, cafeína e fenol. Composição da fase móvel: MeOH: H<sub>2</sub>O, 30:70 (v/v).
- Mistura C: uracila, benzilamina e fenol. Composição da fase móvel: MeOH:tampão fosfato K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7,6; 30:70 (v/v).
- Mistura D: uracila, benzilamina e fenol. Composição da fase móvel: MeOH:tampão fosfato H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 2,7; 30:70 (v/v).

## **3.10 Avaliação da aplicabilidade da fase estacionária Si(PEO)**

A aplicabilidade da fase estacionária Si(PEO) foi avaliada a partir da separação de compostos com características polares. Foram separadas uma mistura de fármacos e uma mistura de agrotóxicos, empregando coluna cromatográfica de 150 mm de comprimento contendo as fases estacionárias Si(PEO) preparadas que apresentaram melhor desempenho cromatográfico.

### **3.10.1 Separação de fármacos**

A fase Si(PEO) foi empregada na separação de fármacos a partir de um medicamento, o Tandene. Tandene tem em sua composição: carisoprodol (125 mg), cafeína (30 mg), diclofenaco

de sódio (50 mg) e paracetamol (300 mg). A separação foi realizada com fase móvel acetonitrila:acetato de amônio  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0,005 mol  $\text{L}^{-1}$ , no modo de eluição por gradiente, com uma vazão de 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm. Cada um dos compostos foi analisado individualmente para a confirmação do tempo de retenção. Esta mistura de fármacos também foi separada por uma coluna recheada com fase comercial  $\text{C}_{18}$ , empregando as mesmas condições de análises utilizadas para a separação na coluna de Si(PEO).

#### *3.10.1.1 Efeito do teor de água na fase móvel*

Os fármacos foram separados em condições diferentes do componente aquoso na fase móvel, para investigar o efeito do teor de água no comportamento de retenção dos fármacos na coluna cromatográfica recheada com a fase Si(PEO). Os testes foram realizados com fase móvel acetonitrila:água, variando a porcentagem em volume de água de 75 a 100%, no modo de eluição por gradiente, com uma vazão de 1,2 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm.

#### *3.10.1.2 Efeito da concentração de acetato de amônio na fase móvel*

Neste estudo, o efeito de diferentes concentrações de acetato de amônio como aditivo do componente aquoso da fase móvel foi explorado. Os fármacos foram separados com fase móvel acetonitrila:acetato de amônio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ), variando a concentração do sal de 5 a 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ , no modo de eluição por gradiente, com vazão de 1,2 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm.

### **3.10.2 Separação de agrotóxicos**

A aplicabilidade da fase Si(PEO) também foi explorada a partir da separação de uma mistura de oito compostos empregados como agrotóxicos em diferentes culturas: 2,4-diclorofenoxiacético, captana, carboxina, clorpirifós, diurom, metomil, terbutilazina e tiofanato metílico; cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 10. Para a obtenção de uma separação satisfatória dos agrotóxicos, foi empregada uma fase móvel isocrática metanol:água (30:70, v/v) com vazão de 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura de 25 °C e detecção UV a 230 nm. Inicialmente, os compostos foram analisados individualmente para a determinação do tempo de retenção. Esta mistura de agrotóxicos também foi separada por uma coluna recheada

com fase comercial C<sub>18</sub>, empregando as mesmas condições de análises utilizadas para a separação na coluna de Si(PEO).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

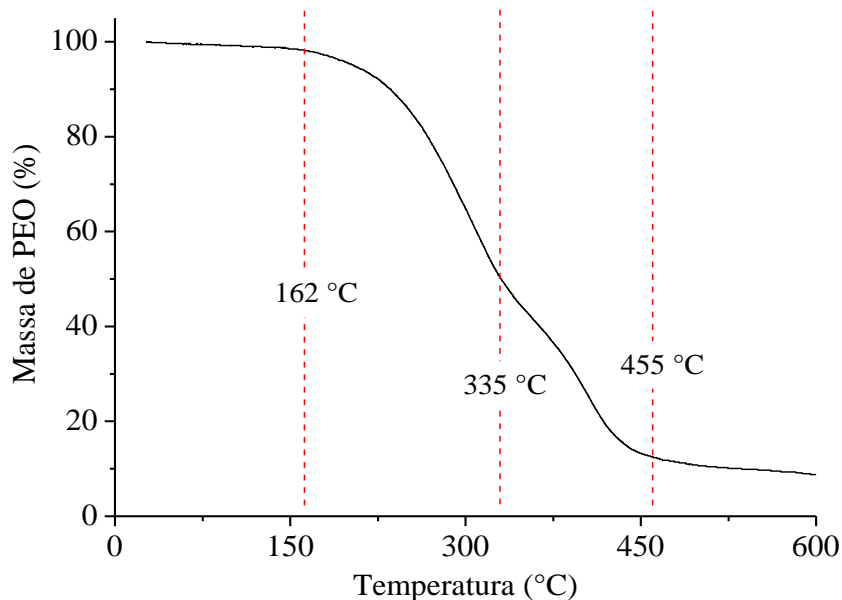
### 4.1 Caracterização físico-química do PEO

Para avaliar a potencialidade do poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) como recobrimento polimérico de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência, foi realizada a caracterização físico-química do PEO empregando as técnicas de análise termogravimétrica, de cromatografia por permeação em gel e de espectroscopia de absorção no infravermelho.

#### 4.1.1 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do copolímero PEO foi analisada por análise termogravimétrica para avaliar a faixa de temperatura que poderia ser utilizada no processo de imobilização térmica no preparo das fases estacionárias. A curva termogravimétrica (curva TG) do PEO está apresentada na Figura 9.

Figura 9. Curva TG para o copolímero poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano).



Na curva termogravimétrica apresentada na Figura 9, três eventos de perda de massa podem ser observados. O primeiro ocorre a uma temperatura de até 162 °C (~ 2 % de perda de massa), referente à eliminação de água da matriz polimérica. O intervalo de 162 a 335 °C, com

perda de massa mais significativa, está relacionado à degradação do bloco do polímero poli(óxido de etileno). O terceiro evento, representado por um ombro a partir de 335 °C na curva TG é referente a degradação do bloco do polímero poli(dimetilsiloxano), que ocorre até aproximadamente 455 °C. Acima de 455 °C há somente a presença de resíduos não voláteis do material, cerca de 7 %. Dados da literatura confirmam que o poli(dimetilsiloxano) apresenta estabilidade térmica até temperaturas próximas a 300°C, e sua decomposição completa ocorre em aproximadamente 600°C (CAMINO; LOMAKIM; LAGEARD, 2001; SCHIAVION, *et al.*, 2002).

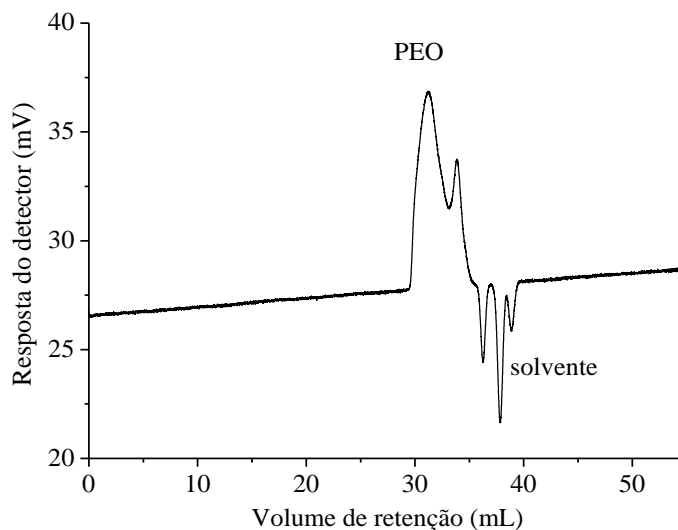
Considerando a curva TG, é possível verificar que o PEO apresenta estabilidade térmica até 160 °C, com perda de massa apenas relacionada à água adsorvida. Essa característica viabiliza a imobilização térmica do copolímero no suporte de sílica até esta temperatura sem que ocorra sua degradação e, conseqüentemente, a alteração de suas características estruturais.

A temperatura de transição vítrea de polímeros, é definida como a passagem do estado vítreo para o estado elastomérico, ou seja, nessa transição o polímero passa de um estado desordenado rígido (vítreo) para um estado desordenado, no qual as cadeias poliméricas possuem uma mobilidade maior. Para os polissiloxanos, a temperatura de transição se encontra abaixo de -20°C (JARDIM; COLLINS; COLLINS, 2004), o que justifica o comportamento do copolímero como solvente durante o processo de separação cromatográfica, que ocorre normalmente à temperatura ambiente. O copolímero como solvente é fundamental no processo de separação, visto que o mecanismo de separação baseia-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Essa temperatura faz com que o copolímero PEO seja interessante para o uso como recobrimento de fases estacionárias, pois possibilita a interação de solutos em condições de temperatura abaixo da temperatura ambiente durante as análises.

#### ***4.1.2 Cromatografia de permeação em gel***

Com a cromatografia de permeação em gel é possível determinar propriedades do polímero, como a polidispersividade e suas massas moleculares médias, possibilitando compreender a estrutura do polímero. A distribuição de massa molecular do PEO foi determinada usando a cromatografia de permeação em gel, de acordo com os resultados apresentados na Figura 10.

Figura 10. Distribuição de massa molecular do copolímero poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) obtido por cromatografia de permeação em gel.



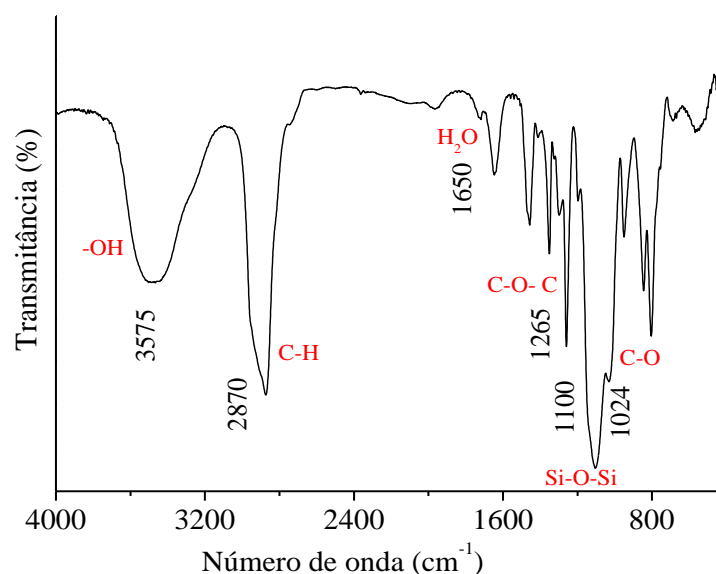
De acordo com a distribuição de massa molecular do copolímero apresentada na Figura 10, determinou-se a massa molecular ponderal média ( $5746 \text{ g mol}^{-1}$ ) e a massa molecular numérica média ( $3796 \text{ g mol}^{-1}$ ). Outros polissiloxanos que são frequentemente utilizados na modalidade de fase reversa, possuem valores de massas moleculares similares aos das massas determinadas para o poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (JARDIM; COLLINS; COLLINS, 2004). Considerando o valor médio das massas moleculares do PEO e a massa molecular de uma unidade monomérica, pode-se estimar que o copolímero possui no máximo 30 repetições da sua unidade, o que representa um comprimento relativamente curto quando comparado aos demais polímeros já utilizados para preparações de fases estacionárias, que possuem comprimentos até maiores que 10.000 unidades monoméricas (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009). O grau de polimerização é adequado, pois permite taxas mais rápidas de transferência de massa.

O polímero é constituído de uma mistura de cadeias poliméricas de tamanhos diferentes, que geram uma distribuição de tamanho molecular. A medida dessa distribuição de tamanhos de cadeias poliméricas é dada pelo índice de polidispersividade, que é igual à razão entre a massa molecular ponderal média e a massa molecular numérica média. Valores de índice entre 1 e 2 correspondem a uma distribuição estreita, ou seja, o PEO que apresentou o índice de polidispersividade de 1,524, é constituído de uma mistura de poucas cadeias poliméricas. Os resultados indicam que o PEO possui características adequadas e interessantes para uso como fase estacionária para CLAE.

### 4.1.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O polímero poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (PEO) foi caracterizado por espectroscopia de absorção no infravermelho, para a identificação de grupos funcionais característicos. O espectro de absorção no infravermelho do PEO está apresentado na Figura 11.

Figura 11. Espectro de absorção do poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) na região do infravermelho.



As principais bandas do espectro referentes aos grupos funcionais característicos do polímero estão indicadas na Figura 13. O sinal na região de  $2870\text{ cm}^{-1}$  é referente à vibração C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  do PEO e, em  $1265\text{ cm}^{-1}$ , tem-se sinal referente a ligações C-O-C. A banda acentuada em  $1100\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento das ligações siloxano, Si-O-Si. As bandas em  $3575$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas aos grupos hidroxilas (OH) provenientes de água. O polímero PEO mantém uma camada de água adsorvida adequada para separações em modos de interação hidrofílica, pois o mecanismo de separação é governado pela solubilidade do analito em uma camada rica de água na superfície da fase estacionária.

## 4.2 Avaliação dos fatores que afetam a imobilização do PEO sobre a sílica

A imobilização do PEO sobre as partículas de sílica é uma etapa fundamental do processo de preparo das fases estacionárias, uma vez que se objetiva recobrir eficientemente os grupos ativos da superfície do suporte para evitar interação do mesmo com os solutos a serem separados.

Muitas variáveis podem afetar o processo de imobilização do polímero no suporte. Neste trabalho, foi realizado inicialmente um estudo para avaliar quais variáveis afetam de forma significativa a incorporação do PEO sobre a sílica. Para evitar um número muito grande de experimentos, considerando que a sílica cromatográfica é relativamente cara o que levaria a um alto consumo de materiais e alto custo na preparação das fases estacionárias, foi aplicado um planejamento fatorial fracionário para a triagem das variáveis selecionadas. As variáveis estudadas foram: o tipo de solvente reacional, a temperatura de imobilização, o tempo de imobilização e a carga polimérica de PEO em dois níveis cada uma, de acordo com os dados da Tabela 1. A resposta medida para cada fase preparada sob as diferentes condições foi a porcentagem de carbono, um indicativo do teor de PEO imobilizado no material. O planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , empregado neste estudo, permitiu a realização de apenas oito experimentos, sendo possível selecionar as variáveis mais importantes para um estudo posterior de otimização, sem a perda de informações relevantes para o estudo. A Tabela 3, apresenta a matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , bem como a porcentagem de carbono imobilizado em cada uma das oito fases Si(PEO) preparadas.

Tabela 3. Porcentagem de carbono nas fases Si(PEO) preparadas de acordo com um planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Experimento	Variáveis				% C
	1	2	3	4	
1	+	+	+	+	6,69
2	+	–	–	+	5,06
3	–	+	–	+	4,57
4	+	+	–	–	2,94
5	–	–	+	+	10,79
6	+	–	+	–	6,50
7	–	+	+	–	4,19
8	–	–	–	–	4,05

A partir dos resultados obtidos pela análise elementar que são apresentados na Tabela 3, pode-se confirmar, junto aos resultados das outras técnicas de caracterização, que o polímero está imobilizado sobre a superfície da sílica. Com os resultados obtidos da porcentagem de carbono referentes à quantidade de PEO imobilizado nas partículas de sílica, foram calculados os efeitos

das variáveis na preparação das fases estacionárias Si(PEO). Os efeitos foram calculados de acordo com a Equação 6.

$$E_f = \overline{\%C}_{(+)} - \overline{\%C}_{(-)} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:  $E_f$  é o efeito da variável;  $\overline{\%C}_{(+)}$  é a porcentagem média de carbono no nível alto da variável e  $\overline{\%C}_{(-)}$  é a porcentagem média de carbono no nível baixo da variável em estudo.

Aplicando a Equação 6 aos resultados obtidos na Tabela 3, podemos verificar que as variáveis apresentam os seguintes valores de efeito: tipo de solvente do meio reacional = -0,60 %C; temperatura de imobilização = -2,00 %C; tempo de imobilização = +2,88 %C e carga de PEO = +2,36 %C. De acordo com os valores dos efeitos de cada variável, a variável que possui menor influência na porcentagem de PEO imobilizada na sílica é o tipo de solvente (variável 1). O sinal negativo indica apenas que o fator no nível baixo tem maior influência na resposta, ou seja, as fases preparadas em hexano produziram um recobrimento ligeiramente melhor que as fases preparadas em clorofórmio.

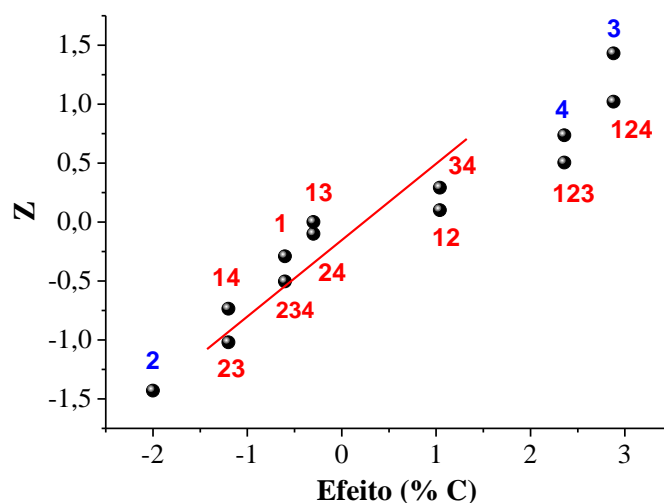
Como os experimentos não foram realizados em replicatas, não foi possível determinar o erro dos efeitos a partir de variâncias individuais dos experimentos. Para estimar o erro dos efeitos foi realizada a análise do gráfico normal dos efeitos (BRUNS; SCARMINIO, 2003). Para tal, foram calculados os efeitos de interações entre os fatores, resultando no total, quinze efeitos: quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores. O cálculo dos efeitos de interação de variáveis, procede-se da maneira usual, multiplicando os sinais dos níveis de elemento a elemento. Primeiro, as interações das variáveis são determinadas pela multiplicação dos níveis de duas a duas, depois de três a três e, finalmente, o produto de todas as quatro variáveis. O conjunto completo está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz de planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$  para as interações entre as variáveis avaliadas no preparo de fases Si(PEO) e porcentagens de carbono.

Exp.	Interações entre as variáveis										%C	
	12	13	14	23	24	34	123	124	134	234		1234
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,69
2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	5,06
3	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	4,57
4	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	2,94
5	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	10,79
6	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	6,50
7	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	4,19
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	4,05

A partir dos dados listados na Tabela 4, os efeitos foram calculados utilizando a Equação 6. Para verificar se o efeito foi significativo ou não, foi construído o gráfico normal dos efeitos, no qual os efeitos que se aproximam de um valor padronizado (Z) igual a zero (pontos centrais) não possuem influência significativa na resposta. Os efeitos mais dispersos desse valor padronizado (Z) igual a zero, são estatisticamente significativos. Os pontos afastados da reta, não pertencem à mesma população que produziu os pontos centrais. Deve-se interpretá-los como efeitos realmente significativos, e tanto mais significativos quanto mais afastados estiverem da região central, seja para a direita ou para a esquerda. O gráfico normal dos efeitos para os experimentos do processo de preparo da fase Si(PEO) está ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Gráfico normal dos efeitos. (•) variáveis principais ou interações entre duas ou mais variáveis.



Observando-se o gráfico da Figura 12, apenas a variável 1 (tipo de solvente) não foi estatisticamente significativa, portanto não interfere no processo de preparo da fase estacionária Si(PEO). Como o tipo de solvente é uma variável discreta, sua otimização foi realizada pela fixação do nível que proporcionou a maior percentagem de carbono na superfície do suporte cromatográfico. Neste caso, como o seu efeito determinado é precedido pelo sinal negativo, o nível baixo (hexano) foi o que proporcionou melhores resultados no preparo da fase estacionária. As demais variáveis avaliadas possuem influência significativa na resposta e necessitam de otimização. Para a otimização dessas variáveis, 2 (temperatura de imobilização), 3 (tempo de imobilização) e 4 (carga polimérica) foi realizado um planejamento composto central.

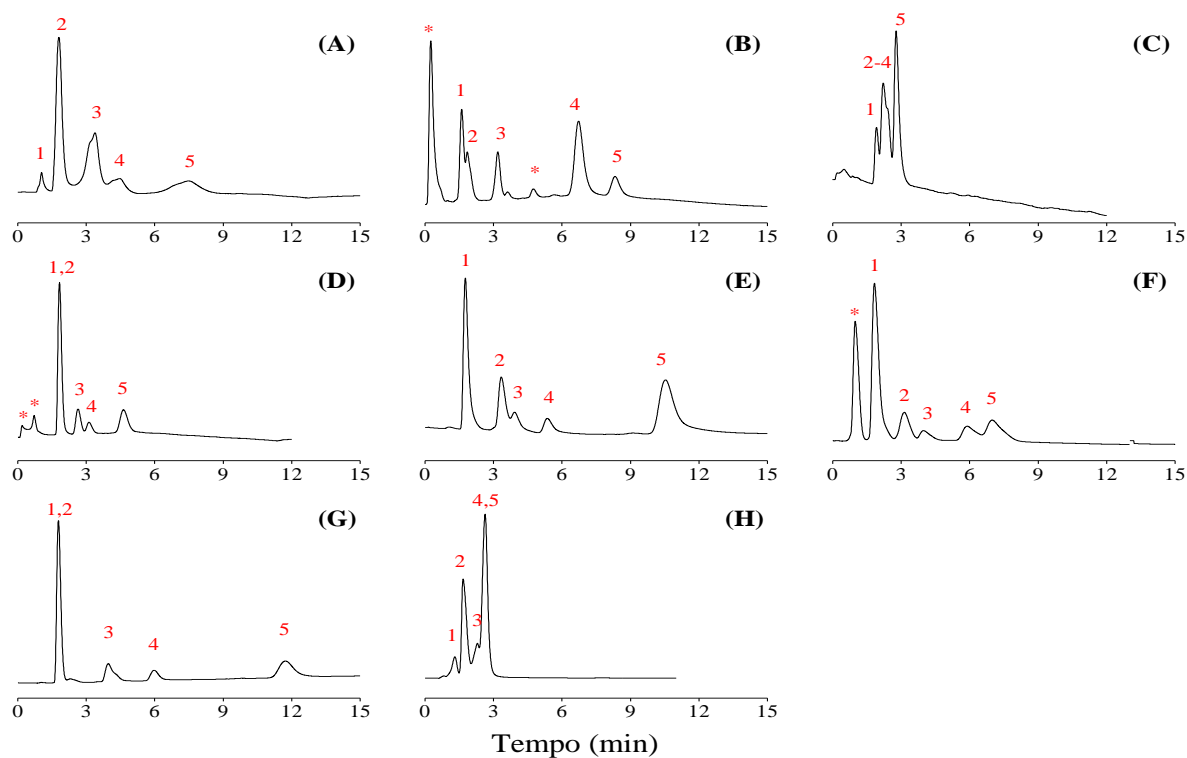
### **4.3 Caracterização cromatográfica das fases Si(PEO)**

As fases estacionárias preparadas a partir da imobilização do PEO sobre partículas de sílica cromatográfica foram avaliadas cromatograficamente a partir da análise de misturas testes padrão para determinar suas propriedades de retenção e o seu desempenho de separação. As misturas testes padrão tratam-se de protocolos bem estabelecidos para aferir a qualidade das fases estacionárias na separação de diferentes tipos de substâncias químicas.

#### ***4.3.1 Mistura teste hidrofóbica***

Inicialmente, as fases foram aplicadas na separação de uma mistura padrão do laboratório (mistura hidrofóbica) para análise das características da fase Si(PEO) quanto ao seu mecanismo de separação. A mistura hidrofóbica é constituída de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno, e normalmente é empregada na avaliação a atuação da fase estacionária na separação de espécies químicas no modo de fase reversa. A composição ideal da fase móvel para a análise da mistura teste nas fases Si(PEO) foi determinada a partir da avaliação de diferentes composições de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O, sempre iniciando o teste com a composição 50:50 (v/v). A composição MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v) foi a que melhor proporcionou a separação dos compostos pelas fases Si(PEO). Os cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(PEO), preparadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(PEO) obtidas do planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ . (A) Exp #1, (B) Exp #2, (C) Exp #3, (D) Exp #4, (E) Exp #5, (F) Exp #6, (G) Exp #7 e (H) Exp #8. Condições de análise: fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v), vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno, (\*) impureza



A partir dos cromatogramas da Figura 13, observa-se que em algumas condições de preparação das fases estacionárias Si(PEO) não foi possível obter separações da mistura hidrofóbica, principalmente nas Figuras 13C e 13H, referentes aos experimentos #3 e #8, respectivamente. Em ambos experimentos o teor de carbono das fases esteve entre os menores de todo estudo, o que pode justificar uma dificuldade na separação. Todas as demais fases apresentaram uma separação melhor, apesar de algumas fases não conseguirem separar de forma adequada a benzonitrila da uracila, como mostrado nas Figuras 13B, 13D e 13G, que também estão associadas às fases com menores teores de carbono, experimentos #2, #4 e #7, respectivamente. Desta forma, as fases com maiores teores de carbono apresentaram separação total dos compostos da mistura hidrofóbica, corroborando com o fato de que quanto maior o teor de carbono na fase, maior a garantia de um melhor recobrimento da superfície do suporte e melhor o desempenho da fase na separação de solutos. É importante mencionar que apesar da característica mais polar da camada de fase estacionária de PEO, todas as fases apresentaram

características de fase reversa, permitindo a retenção mais forte de compostos apolares (naftaleno) e mais fraca de espécies polares (como a benzonitrila nesta mistura).

Os parâmetros cromatográficos dos picos dos compostos obtidos da separação da mistura hidrofóbica pelas fases estacionárias Si(PEO) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros cromatográficos de desempenho e porcentagem de carbono das fases Si(PEO) preparadas em diferentes condições de acordo com o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Fases Si(PEO)	$k^{a,b}$	$A_s$ 10% <sup>b</sup>	$R_s^c$	N/m <sup>b</sup>	%C
(1)	6,12	0,78	1,79	3.100	6,69
(2)	4,17	2,20	1,24	27.500	5,06
(3)	1,45	1,79	1,21	13.200	4,57
(4)	1,53	2,20	1,82	12.200	2,94
(5)	4,98	2,61	1,39	19.900	10,79
(6)	6,06	2,23	1,00	7.500	6,50
(7)	5,58	2,00	3,57	26.100	4,19
(8)	2,16	0,42	1,97	11.100	4,05

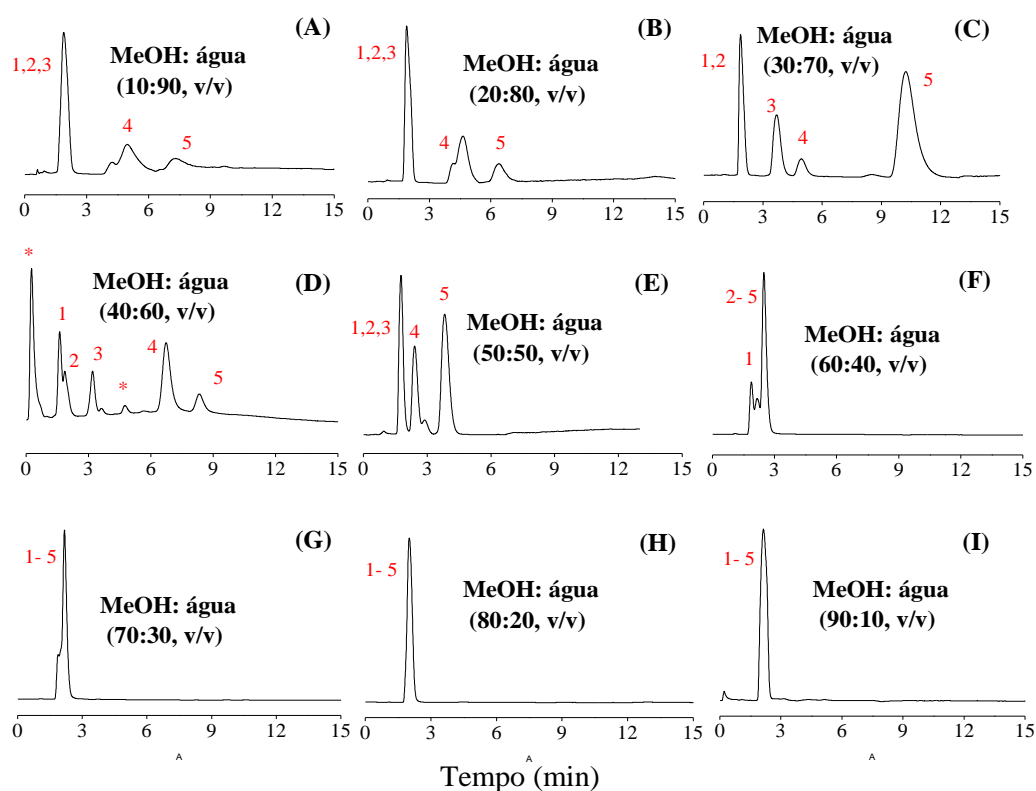
<sup>a</sup> medido pelo tempo de retenção da uracila; <sup>b</sup> medido para o pico do naftaleno; <sup>c</sup> medido para o par tolueno-naftaleno.

A fase Si(PEO), obtida do experimento #5, foi a que apresentou uma porcentagem de carbono muita acima das demais (10,79 %), porém, verifica-se que não foi a que apresentou melhor desempenho cromatográfico, de acordo com o número de pratos determinado nesta condição. Espera-se que uma maior quantidade de carbono presente no material proporcione melhor eficiência para a fase estacionária, porém, quantidades de polímero muito elevadas podem também resultar em uma camada polimérica mais espessa e bloquear os poros do suporte cromatográfico, fazendo com que o transporte de massa dos analitos seja lento, diminuindo, consequentemente, o desempenho cromatográfico da fase. Fases estacionárias com melhor desempenho cromatográfico estão associadas com um recobrimento mais eficiente da superfície do suporte pela camada polimérica. Este melhor recobrimento está associado a um melhor rearranjo do polímero de forma a constituir uma camada polimérica fina que reveste a superfície da partícula de sílica. Esta condição parece ter sido melhor alcançada com as fases #2 e #7, de acordo com a Tabela 5, pois apresentaram o maior número de pratos (27.500 e 26.100 pratos  $m^{-1}$ , respectivamente), que está associado à maior eficiência de separação das colunas. Este estudo foi realizado apenas para fazer uma triagem das variáveis que afetam no

preparo da fase estacionária. A otimização do desempenho das fases Si(PEO) foi realizada a partir do planejamento composto central para as variáveis que mostraram afetar significativamente na imobilização do polímero à superfície da sílica.

A fase Si(PEO) #2, que apresentou maior número de pratos e portanto, melhor desempenho cromatográfico, foi submetida à separação da mistura teste hidrofóbica com diferentes composições de solvente orgânico na fase móvel. Na Figura 14 estão apresentados os cromatogramas obtidos na separação da mistura teste pela fase Si(PEO)#2.

Figura 14. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pela fase Si(PEO)#2, preparada em clorofórmio, temperatura de imobilização 100°C por 8h, e carga polimérica 50 % m/m. Condições de análise: fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (A) 10:90, v/v, (B) 20:80, v/v, (C) 30:70, v/v, (D) 40:60, v/v, (E) 50:50, v/v, (F) 60:40, v/v, (G) 70:30, v/v, (H) 80:20, v/v, (I) 90:10, v/v. Vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno, (\*) impurezas.



De acordo com os cromatogramas da Figura 14, observa-se que com uma maior composição de água na fase móvel (cromatogramas A, B e C), os compostos da mistura teste hidrofóbica não foram completamente separados. As separações resultaram em tempos de

análises muito longos, picos alargados e com baixa resolução. Com o aumento da quantidade de solvente orgânico na fase móvel, composição MeOH: H<sub>2</sub>O (40:60,v/v) (cromatograma D), tem-se um tempo adequado de análise, de aproximadamente 10 minutos para a fase estacionária em questão, com boa separação de todos os compostos da mistura teste. Nestas composições de fase móvel, com o aumento de solvente orgânico, maior é a força de eluição da fase móvel e, portanto, os compostos hidrofóbicos conseguem ser separados. Em composições maiores de solvente orgânico (cromatogramas F a I), os compostos coeluíram, ou seja, os compostos tiveram pouca interação com a fase estacionária.

Mesmo com característica polar, a fase estacionária Si(PEO)#2 resultou em separações típicas da modalidade de fase reversa, requerendo baixas porcentagens de componente orgânico na fase móvel para separar os compostos da mistura hidrofóbica.

#### 4.3.2 Misturas testes de Tanaka e colaboradores

O protocolo de caracterização cromatográfica desenvolvido por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989) é um método bem estabelecido e aplicado por diversos grupos de pesquisas e fabricantes de fases estacionárias para avaliar as propriedades de retenção das fases estacionárias na modalidade reversa. As propriedades das fases Si(PEO) preparadas em diferentes condições, definidas no planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup>, foram avaliadas pelo protocolo de Tanaka. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

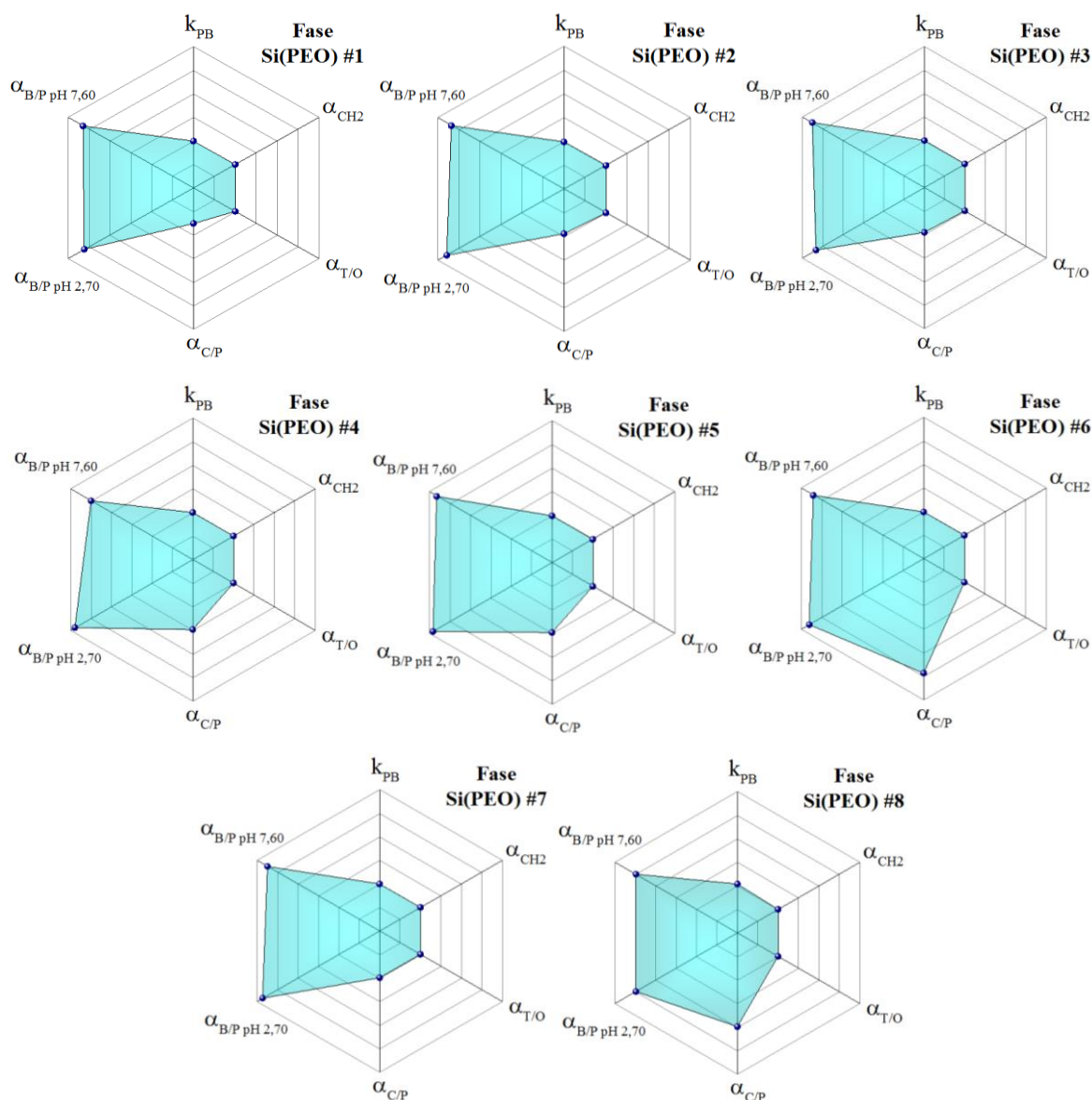
Tabela 6. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(PEO) preparadas em diferentes condições.

Fase Si(PEO)	$k_{PB}$	$\alpha_{CH2}$	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{C/P}$	$\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$	$\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$
(1)	1,00	1,00	1,00	2,24	0,76	0,70
(2)	1,00	1,00	1,00	2,06	0,41	0,63
(3)	1,00	1,00	1,00	2,04	0,64	0,46
(4)	1,00	1,00	1,00	1,51	0,20	1,00
(5)	1,00	1,00	1,00	1,52	0,17	0,35
(6)	1,00	1,00	1,00	0,56	0,38	0,58
(7)	1,00	1,00	1,00	2,00	0,26	0,50
(8)	1,04	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Observa-se a partir dos dados apresentados na Tabela 6, que a hidrofobicidade ( $k_{PB}$ ), a seletividade hidrofóbica ( $\alpha_{CH2}$ ) e a seletividade estérica ( $\alpha_{T/O}$ ), que são parâmetros obtidos com a separação da mistura A do protocolo de Tanaka, apresentaram valores iguais a 1, devido à não separação dos compostos dessa mistura. Essa mistura é constituída apenas de compostos hidrofóbicos, o que indica que as fases Si(PEO), independente das condições de preparação, não possui seletividade hidrofóbica adequada para separar compostos apolares. Este comportamento já era esperado devido a fase Si(PEO) possuir certo grau de polaridade, referente ao grupo éter presente na estrutura polimérica. Por outro lado, as três misturas restantes, misturas B, C e D, apresentaram separação adequada dos compostos. Estas misturas são constituídas de compostos mais polares, indicando que as fases Si(PEO) apresentam seletividade adequada para separação de compostos polares. Este fato está associado às características polares do polímero que promove uma maior interação com as substâncias polares, promovendo a separação entre elas.

Considerando a dificuldade de identificar a melhor fase Si(PEO) dentre todas as condições avaliadas com base nos diferentes parâmetros de retenção obtidos da separação das misturas do protocolo de Tanaka, os resultados cromatográficos de cada fase Si(PEO) foram agrupados em um gráfico do tipo radar. Neste gráfico, cada um de seus seis eixos correspondem a uma propriedade de retenção obtida pela separação das misturas de Tanaka empregando as fases Si(PEO). Os valores dessas propriedades, listados na Tabela 6, foram atribuídos aos respectivos eixos do gráfico radar. A fase Si(PEO) que apresentou a maior área hachurada foi considerada a que possui valores mais adequados para os parâmetros de retenção dentre as diferentes fases estacionárias preparadas em condições distintas. A Figura 15, apresenta os gráficos do tipo radar que reúnem os seis parâmetros medidos pelo protocolo de Tanaka para cada fase Si(PEO).

Figura 15. Parâmetros de retenção obtidos pelo protocolo de Tanaka para as fases estacionárias Si(PEO) preparadas de acordo com o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .



A partir dos gráficos radar da Figura 15, observa-se que a fase Si(PEO) obtida do experimento #6 apresentou o melhor resultado global em termos de retenção pelo protocolo de Tanaka. Nesta fase, o teor de carbono e consequentemente do PEO não foi o maior, porém um dos maiores entre todas as fases e as condições, mesmo ainda não otimizadas, apresentou retenção adequada para os compostos das misturas B, C e D do protocolo de Tanaka. O principal diferencial de uma forma geral entre todas as fases Si(PEO) produzidas foi a capacidade de separar os compostos polares das misturas do protocolo de Tanaka e a ineficiência de separar os compostos apolares de acordo com as condições de análise sugeridas no protocolo. Logo, apesar das fases Si(PEO) apresentarem ordem de eluição dos compostos que obedecem ao mecanismo

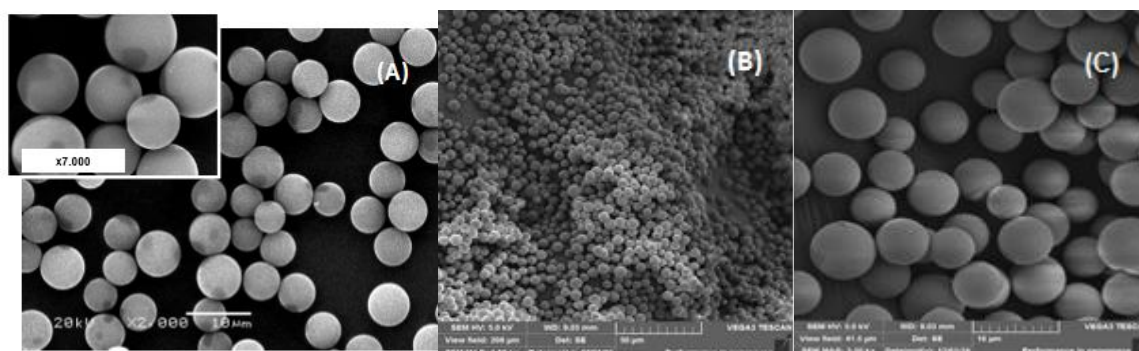
de fase reversa, elas apresentam seletividade diferenciada para substâncias polares, o que sugere que uma otimização adequada poderá levar as fases a separação dos compostos em uma modalidade de interação hidrofílica, objetivo deste trabalho.

#### 4.4 Caracterização físico-química das fases Si(PEO)

##### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas do suporte de sílica foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), após o processo de imobilização do polímero PEO. A Figura 16 apresenta as micrografias eletrônicas da fase estacionária Si(PEO).

Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura do (A) suporte cromatográfico de sílica (ampliação de 7k vezes) e da (B) (C) fase estacionária Si(PEO)#1, imobilizada a 100 °C por 8 h, com 25% (m/m) de carga polimérica em hexano (ampliação de 1k e 7k vezes, respectivamente).



O estudo morfológico da fase Si(PEO) permite avaliar a regularidade das suas partículas, quanto à forma e tamanho, bem como avaliar o grau de aglomeração das partículas após o processo de imobilização polimérica. Comparando as micrografias do suporte de sílica nua (Figura 16A) e da fase estacionária Si(PEO) (Figura 16B e 16C), verifica-se que o procedimento de imobilização polimérica não afetou a estrutura morfológica esférica do suporte de sílica de maneira significativa, apresentando boa regularidade das partículas após o processo de preparação das fases. A camada polimérica de PEO depositada sobre as partículas de sílica não provocou a formação de aglomerados de partículas, que poderiam afetar negativamente o recheio das colunas de aço inox com a fase Si(PEO). Quanto maiores a uniformidade da distribuição do tamanho do material de recheio e a regularidade do formato das partículas melhor será a

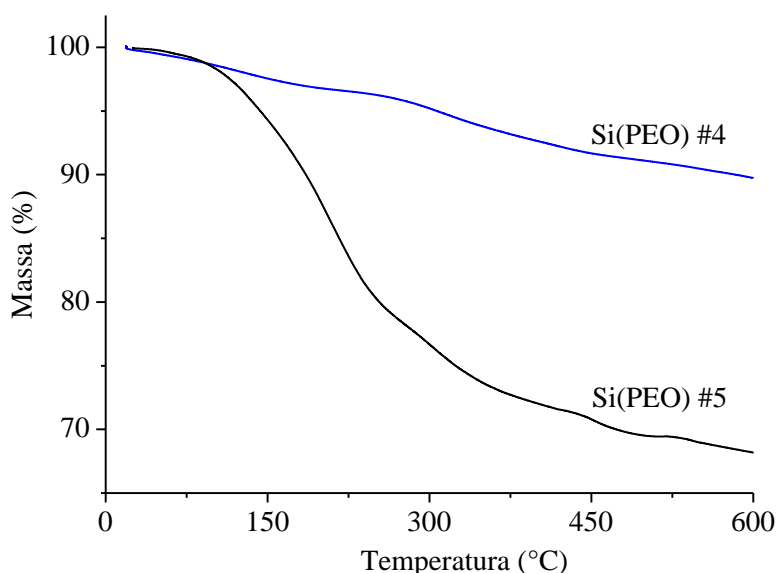
compactação das partículas dentro da coluna cromatográfica e, conseqüentemente, maior será a eficiência de separação.

As micrografias indicaram também que as etapas de lavagem da fase estacionária no processo de preparo foram eficientes e de grande importância para remoção de material orgânico residual, pois não há presença de resíduos de reagentes ou de aglomerados das partículas de sílica.

#### 4.4.2 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das fases Si(PEO)#4 e Si(PEO)#5, que representam fases com a menor e a maior quantidade de PEO imobilizadas, foi avaliada por análise termogravimétrica. As curvas TG obtidas para as fases estão apresentadas na Figura 17.

Figura 17. Curvas termogravimétricas para as fases estacionárias Si(PEO)#4 e Si(PEO)#5.



Analisando as curvas termogravimétricas apresentadas na Figura 17, observa-se que as fases estacionárias apresentaram perdas de massas contínuas ao longo da faixa de temperatura de 25 a 600 °C. As principais perdas estão relacionadas à desidratação, degradação do polímero PEO e à desidroxilação dos grupos silanóis superficiais da sílica dentro desta faixa. A degradação da fase Si(PEO) #5 teve início a partir de 25 °C, indicando uma possível presença de resíduos de solvente orgânico na fase, o que justifica um teor elevado de carbono no material, muito superior às demais fases. A queda acentuada a partir de aproximadamente 140 °C é um indicativo de que pequenas frações de polímero não imobilizado na superfície da sílica também podem estar presente nesta fase. A fase Si(PEO) #4 por apresentar menor quantidade de carbono também

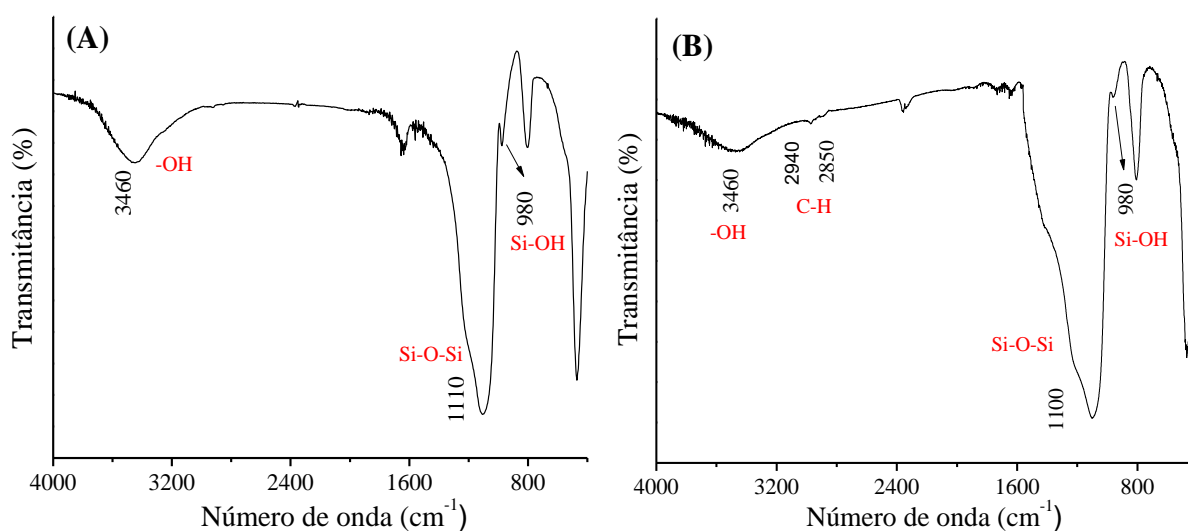
apresentou menor perda da porcentagem de massa ao longo do aquecimento. A perda total de massa da fase Si(PEO)#5 foi cerca de 18% da massa inicial, e de aproximadamente 5% para a fase Si(PEO)#4, indicando que esta segunda possui de fato, uma quantidade relativamente baixa de material orgânico na superfície da sílica.

As fases Si(PEO) apresentaram temperatura de início de degradação superior à temperatura de degradação do polímero ( $\sim 162^\circ\text{C}$ ), como pode ser observado na Figura 17. Isto significa que há mudanças da estabilidade térmica do polímero quando incorporado ao suporte cromatográfico.

#### 4.4.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais característicos na fase estacionária Si(PEO) e na sílica nua foi realizada por espectroscopia de absorção no infravermelho com o intuito de confirmar a incorporação do polímero ao suporte cromatográfico de sílica. A Figura 18 apresenta os espectros obtidos na região do infravermelho do suporte de sílica nua e da fase Si(PEO).

Figura 18. Espectros de absorção da (A) sílica nua e da (B) fase estacionária Si(PEO)#1, imobilizada a  $100^\circ\text{C}$  por 8 h, com 25% (m/m) de carga polimérica em hexano.



Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentados na Figura 18 permitem verificar que houve a imobilização do polímero PEO sobre as partículas de sílica via tratamento térmico. Comparando o sinal em  $980\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à vibração OH de grupos silanóis livres, no

espectro da sílica nua com o espectro da fase Si(PEO) observa-se a mudança do perfil deste sinal. Esta mudança pode estar associada à imobilização do PEO em alguns dos grupos silanóis da superfície da sílica ou do recobrimento desses pela camada polimérica, uma vez que o recobrimento polimérico dos silanóis os protege da incidência da radiação infravermelha. No espectro da fase Si(PEO) a região de  $2940\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao estiramento C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  do PEO, e a banda acentuada em  $1100\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento das ligações siloxano (Si-O-Si) presentes na estrutura da sílica. O alargamento do sinal intenso em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  no espectro da fase Si(PEO) é um forte indicativo de que o PEO foi imobilizado na sílica, uma vez que o alargamento pode ter sido provocado pela superposição do sinal em  $1265\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C-O-C do grupamento éter do polímero com o sinal de estiramento Si-O-Si da sílica. A banda na região espectral de aproximadamente  $3460\text{ cm}^{-1}$ , referente a vibrações de grupos OH residuais e moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvidas na superfície do material, indica que não houve recobrimento total dos grupos Si-OH da superfície da sílica pelo polímero.

De uma forma geral, os resultados obtidos com a espectroscopia de absorção no infravermelho e por análise elementar (valores de %C imobilizado na superfície da sílica apresentados na Tabela 4) se mostram complementares. Ambos os resultados sugerem que houve a incorporação do polímero à sílica, porém não ocorre o recobrimento total dos grupos ativos presentes no suporte.

Tonhi *et.al.* (2005) em seu trabalho, desenvolveu fases estacionárias baseadas na imobilização térmica do poli(dimetilsiloxano) (PDMS) sobre partículas de sílica. As fases estacionárias sorvidas foram submetidas ao tratamento térmico, variando a temperatura de imobilização de 80 a  $240^\circ\text{C}$ , entre 4 a 30 horas para imobilização do polissiloxano no suporte de sílica. Estas fases Si(PDMS) apresentaram porcentagens até 11,9% de carbono imobilizado sobre o suporte de sílica.

Em comparação com fases estacionárias baseadas na imobilização polimérica de polissiloxanos encontradas na literatura, algumas das fases Si(PEO) preparadas no presente trabalho, apresentaram valores mais baixos de porcentagens de carbono incorporado na superfície do suporte de sílica, e consequentemente de polímero. Esses resultados ocorrem devido ao polímero poli(óxido de etileno- co- dimetilsiloxano) possuir em sua estrutura maior número de bloco poli(óxido de etileno) em relação ao bloco poli(dimetilsiloxano), (75% poli(óxido de etileno), 25% poli(dimetilsiloxano)). Porém, mesmo com essa característica, pode ser verificado de acordo com a Tabela 5 que a fase Si(PEO)#5 por exemplo, apresenta alto valor de porcentagem de carbono imobilizado (10,79 %C).

## 4.5 Otimização do preparo das fases Si(PEO)

### 4.5.1 Planejamento composto central (PCC)

Para a otimização das variáveis que influenciam significativamente no preparo da fase estacionária, foram realizados mais sete experimentos de acordo com o planejamento composto central (PCC). O PCC consiste em experimentos de acordo com um planejamento fatorial fracionário  $2^{k-p}$ , de experimentos em um ponto central, que é executado com réplicas e têm duas finalidades: fornecer uma medida do erro e estabilizar a variância da resposta prevista; e experimentos realizados em pontos axiais.

Nos experimentos deste estudo, o solvente foi fixado no nível baixo (as fases foram preparadas em tolueno) e o tempo de imobilização do polímero no suporte cromatográfico foi fixado em 16h. O tempo de imobilização foi fixado no nível alto devido as fases Si(PEO) preparadas nesta condição, resultarem em maiores porcentagens de carbono imobilizado, como pode ser observado à partir dos valores listados na Tabela 5.

As fases estacionárias foram preparadas de acordo com a matriz do PCC apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz para o planejamento composto central.  $x_2$  e  $x_4$  representam os valores das duas variáveis codificados pelas equações:  $x_2 = \frac{T-125}{25}$  e  $x_4 = \frac{C-37,5}{12,5}$ .

Experimento	Temperatura (°C)	Carga Polimérica (%)	$x_2$	$x_4$
(9)	125	37,5	0	0
(10)	125	37,5	0	0
(11)	125	37,5	0	0
(12)	90	37,5	-1,4	0
(13)	160	37,5	+1,4	0
(14)	125	20	0	-1,4
(15)	125	25	0	+1,4

Na Tabela 8, estão listados os valores de porcentagem de carbono presentes nas fases estacionárias Si(PEO) preparadas e os parâmetros cromatográficos obtidos a partir da separação da mistura hidrofóbica.

Tabela 8. Parâmetros cromatográficos de desempenho e porcentagem de carbono das fases Si(PEO) preparadas em diferentes condições de acordo com o planejamento composto central.

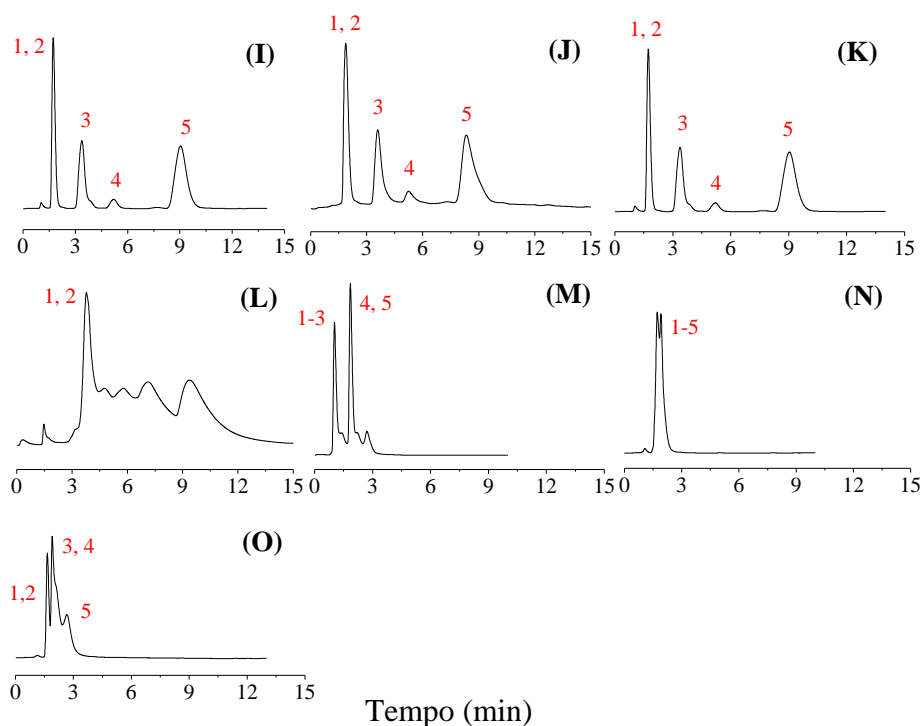
<b>Fases Si(PEO)</b>	<b>k<sup>a,b</sup></b>	<b>A<sub>s</sub> 10%<sup>b</sup></b>	<b>R<sub>s</sub><sup>c</sup></b>	<b>N/m<sup>b</sup></b>	<b>C%</b>
<b>(9)</b>	3,42	2,45	0,90	11.700	6,83
<b>(10)</b>	3,45	2,53	0,90	11.700	6,83
<b>(11)</b>	4,25	1,31	1,22	13.500	6,83
<b>(12)</b>	1,48	4,20	0,92	3.200	5,59
<b>(13)</b>	1,65	1,91	1,14	6.400	6,57
<b>(14)</b>	1,00	1,96	2,44	14.200	4,49
<b>(15)</b>	0,15	4,30	0,81	6.900	5,94

<sup>a</sup> medido pelo tempo de retenção da uracila; <sup>b</sup> medido para o pico do naftaleno; <sup>c</sup> medido para o par tolueno-naftaleno.

A separação da mistura hidrofóbica empregando as fases estacionárias Si(PEO) preparadas de acordo com o PCC, foi realizada em condição de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v). Os cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica obtidos pelas fases Si(PEO) preparadas de acordo com o planejamento axial e ponto central estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(PEO) obtidas a partir do PCC. (I) Exp #9, (J) Exp #10, (K) Exp #11, (L) Exp #12, (M) Exp #13, (N) Exp #14, (O) Exp #15.

Condições de análise: fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v), vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno, (\*) impureza.



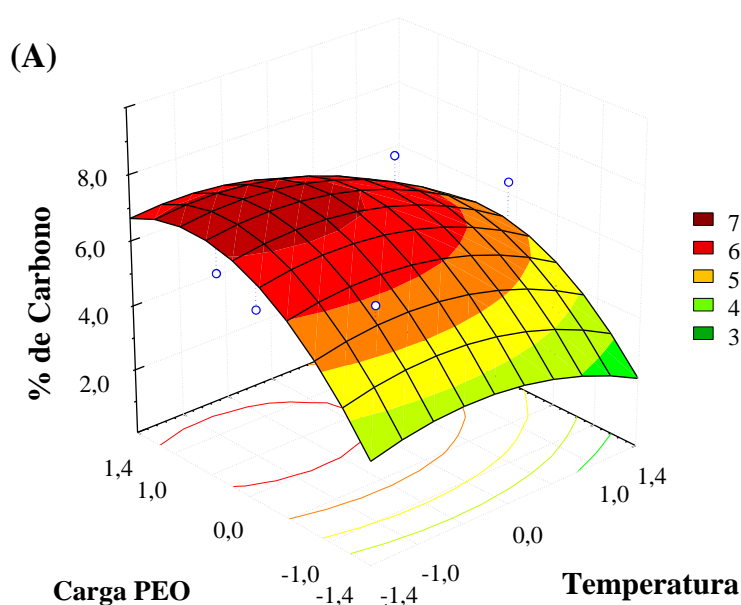
A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 19, observa-se que as fases estacionárias não foram capazes de separar completamente todos os compostos da mistura hidrofóbica. Para os experimentos no ponto central, cromatogramas I, J e K, observam-se separações muito similares para as fases. Considerando que as três fases se tratam de réplicas autênticas, pode-se observar que a preparação das fases se apresentaram com boa repetibilidade, sendo confirmados pelos parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela 8.

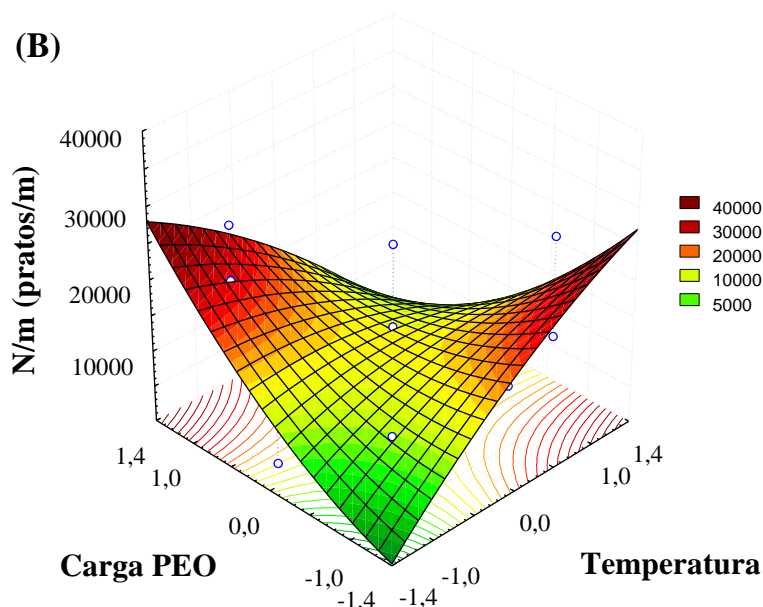
Os valores determinados de porcentagem de carbono, listados na Tabela 8, foram próximos aos valores determinados para as fases Si(PEO) que apresentaram melhor eficiência, as fases #2 e #7 (5,06 e 4,19 %C, respectivamente). Apesar de apresentarem quantidades de polímero imobilizado similares, as fases estacionárias preparadas no PCC obtiveram menores eficiências de colunas (menor número de pratos), de acordo com os dados da Tabela 8. As condições de preparação das fases Si(PEO) de acordo com o planejamento axial e o ponto do central do PCC levaram a um material com menor eficiência de separação, principalmente nas condições do planejamento axial.

A realização do planejamento de experimentos teve como objetivo a otimização das condições de preparo da fase Si(PEO). No procedimento de otimização, o primeiro passo é identificar uma função matemática que modele a variação das respostas em função da variação dos fatores nos níveis investigados. A variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície de resposta, cuja a região investigada é uma função polinomial das variáveis, as respostas podem ser estimadas por uma equação quadrática (KLEIJNEN,1998). Para isto, superfícies de respostas em termos de porcentagem de carbono e de eficiência de coluna (número de pratos, N), foram construídas para encontrar a melhor condição de preparo das fases, considerando a temperatura de imobilização e a carga polimérica como variáveis deste processo.

A partir dos resultados de porcentagem de carbono nas fases preparadas e do número de pratos calculados, a partir da análise elementar e separação da mistura teste padrão, respectivamente, foi ajustado um modelo quadrático, determinando os valores dos estimadores dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados (BRUNS; SCARMINIO, 2003), empregando o programa STATISTICA®. As superfícies de respostas para as variáveis estudadas, carga polimérica e temperatura de imobilização, estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20. Superfície de respostas para a carga polimérica e temperatura de imobilização na preparação de fases estacionárias Si(PEO) imobilizadas termicamente, em termos de (A) porcentagem de carbono do PEO incorporada à superfície da sílica e (B) eficiência da coluna cromatográfica, N.





Considerando que uma maior porcentagem de carbono pode proporcionar melhor recobrimento do suporte cromatográfico e, desta forma, minimizar as interações indesejadas dos componentes a serem separados com a superfície da sílica, de acordo com a superfície de resposta em termos de porcentagem de carbono apresentada na Figura 20A, observa-se que a região de máximo está dentro dos níveis investigados. Esta região corresponde ao ponto de ótimo das condições de temperatura de imobilização em aproximadamente 110 °C, e de carga polimérica em torno de 50% (m/m) que resultarão na maior incorporação de PEO na superfície da sílica.

Em termos de eficiência de coluna (N), Figura 20B, observa-se que a condição ótima de temperatura de imobilização e carga polimérica que resulta em uma máxima eficiência para a coluna recheada com Si(PEO), apresenta duas regiões de maiores respostas, porém o máximo não se encontra dentro das condições experimentais estudadas. Verifica-se que em condições de imobilização do polímero no suporte de sílica com baixas temperaturas e maiores porcentagens de carga polimérica, tende à condição de ótimo, bem como para temperaturas mais elevadas e menores cargas poliméricas. Estas condições são representadas pela cor vermelha mais escura, que corresponde a aproximadamente 27.000 pratos  $m^{-1}$ . Assim, de acordo com as superfícies de respostas, dentre as condições estudadas, a fase Si(PEO)#2 preparada com temperatura de imobilização de 100 °C e carga polimérica de 50 % (m/m) do PEO, foi considerada a condição ótima das variáveis estudadas no preparo da fase estacionária.

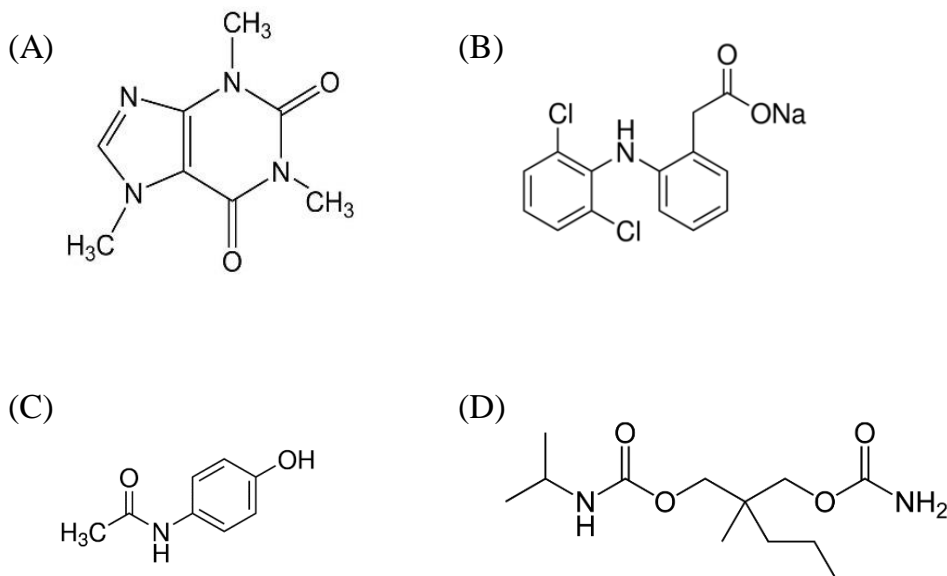
#### **4.6 Avaliação da aplicabilidade da fase estacionária Si(PEO)**

A potencialidade das fases estacionárias preparadas foi avaliada pela capacidade de separação de compostos que normalmente são difíceis de serem separados com boa eficiência em fases estacionárias na modalidade fase reversa. Para tal estudo, foi empregado uma coluna cromatográfica de 150 mm de comprimento por 4,0 mm de diâmetro interno, recheada com a fase Si(PEO)#2. Com uma coluna cromatográfica maior, aumenta-se o número de estágios de equilíbrio entre o analito e a fase móvel, e entre o analito e a fase estacionária, ou seja, maior será o desempenho cromatográfico. Portanto, para o recheio da coluna cromatográfica foi utilizada a fase preparada que apresentou melhor desempenho cromatográfico de acordo com os resultados de otimização. Esta coluna cromatográfica foi aplicada na separação de duas classes de compostos com características mais polares, tais como fármacos e agrotóxicos.

##### ***4.6.1 Separação de fármacos***

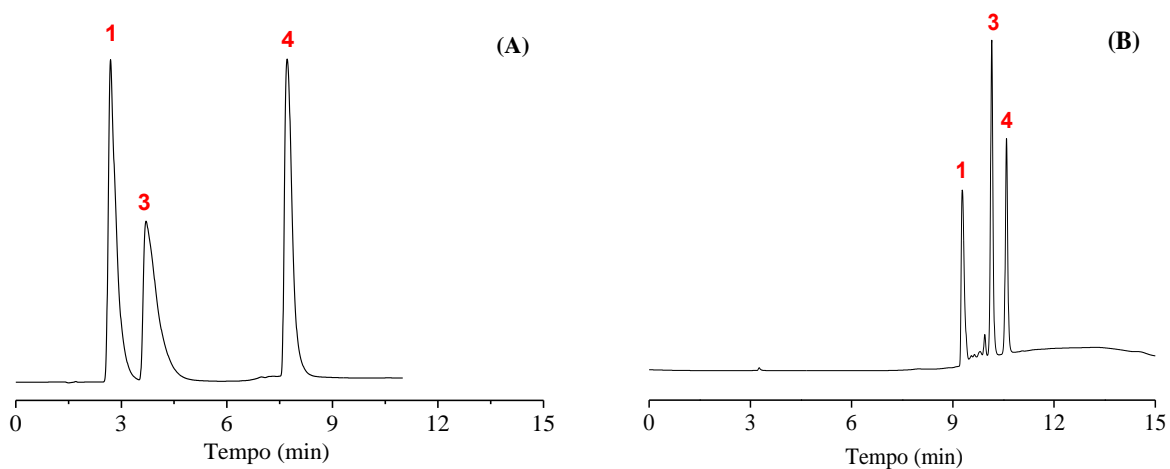
Foi realizada a separação de quatro fármacos à partir de um medicamento, o Tandene. Tandene é um medicamento indicado para o tratamento de reumatismo, conjunto de doenças que pode afetar as articulações, músculo e esqueleto, caracterizado por dor, restrição de movimento e eventuais sinais inflamatórios. O medicamento apresenta uma composição relaxante muscular anti-inflamatória e analgésica. Tandene tem em sua composição: carisoprodol (125 mg), que é um relaxante muscular; a cafeína (30 mg), estimulante do sistema nervoso central; o diclofenaco de sódio (50 mg), importante anti-inflamatório que atua no combate da dor e na diminuição de sintomas como a febre e inchaços localizados; e o paracetamol (300 mg) que também possui ação anti-inflamatória e atua sinergicamente no controle da dor e da temperatura. As estruturas químicas de cada um dos fármacos estão apresentadas na Figura 21.

Figura 21. Estrutura química dos fármacos: (A) Cafeína, (B) Diclofenaco de sódio, (C) Paracetamol e (D) Carisoprodol.



A Figura 22 mostra os cromatogramas da separação dos fármacos, de características polares, pela fase Si(PEO) e por uma coluna comercial C<sub>18</sub>, empregando fase móvel acetonitrila:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> a 0,005 mol L<sup>-1</sup>, no modo de eluição por gradiente.

Figura 22. Cromatograma de separação de fármacos pelas fases: (A) Si(PEO) e (B) coluna comercial C<sub>18</sub>. Compostos: (1) paracetamol, (2) carisoprodol, (3) cafeína, (4) diclofenaco de sódio. Condições de análise: fase móvel ACN: CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 0,005 mol/L. 0-4 min (1:99, v/v); 4-5 min (20:80, v/v); 5-10 min (20:80, v/v). Vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV 254 nm.



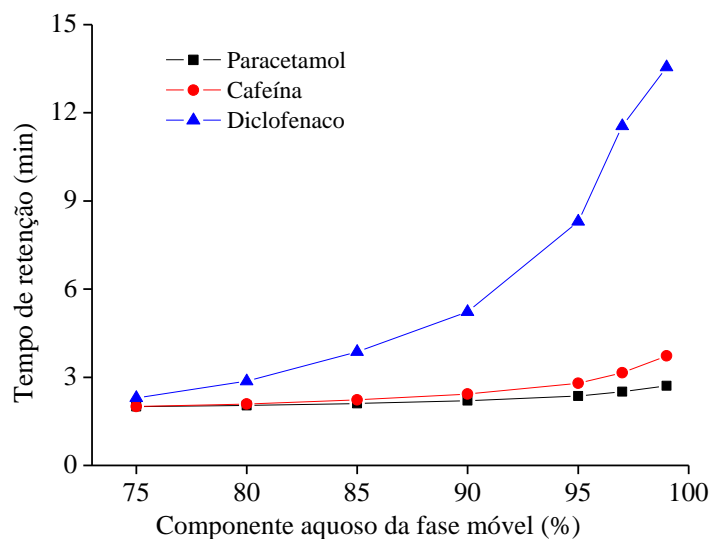
A partir do cromatograma apresentado na Figura 22A, observam-se três picos bem separados e com boa resolução, referentes ao paracetamol, a cafeína e ao diclofenaco de sódio. O fármaco carisoprodol não foi determinado por não absorver em uma região analítica do ultravioleta. O sal acetato de amônio foi utilizado na análise para neutralizar as cargas dos analitos, impedindo interações eletrostáticas com as fases estacionárias. A fase Si(PEO) apresentou como vantagem a possibilidade de eluição por gradiente, modo este, incompatível com fases baseadas em imobilização polimérica devido a lixiviação do líquido estacionário durante a eluição da fase móvel. Este fato mostra que o PEO ficou fortemente adsorvido na superfície da sílica. A fase apresenta um excelente desempenho para separar os fármacos, com eficiência de coluna de 72.000 pratos  $m^{-1}$  para o pico do diclofenaco de sódio.

A mesma mistura de fármacos foi separada também por uma coluna  $C_{18}$  comercial sob as mesmas condições, para fins de comparação com o material preparado no laboratório. De acordo com os cromatogramas apresentados na Figura 22, verifica-se que a separação dos fármacos pela fase Si(PEO) foi eficiente e mais rápida quando comparada com a coluna  $C_{18}$  comercial. Apesar de ambas separarem satisfatoriamente os compostos, a coluna  $C_{18}$  não foi capaz de eluir os compostos quando a fase móvel foi composta com apenas 1% de solvente orgânico, requerendo mais de 5 minutos de eluição com 20% de acetonitrila para que os compostos iniciassem a eluição. Além disso, é importante ressaltar que colunas comerciais convencionais não podem ser empregadas de forma contínua em separações com elevado teor de componente aquoso, uma vez que estas condições podem levá-las ao colapso. Fenômeno que está relacionado ao emaranhamento das cadeias alquilas da fase estacionária, resultando na perda de sua eficiência e, consequente, na perda da capacidade de separação. Fases estacionárias com polímeros imobilizados, como a Si(PEO), não apresentam esse problema, uma vez que a camada polimérica fica aderida como uma fina camada horizontal na superfície do suporte.

#### *4.6.1.1 Efeito do teor de água na fase móvel*

Os fármacos foram separados com fase móvel acetonitrila:água, variando a porcentagem em volume de água de 75 para 100 %, para avaliar as diferentes retenções dos compostos na coluna cromatográfica. Os resultados dos testes cromatográficos realizados, estão apresentados no gráfico apresentado na Figura 23.

Figura 23. Efeito do teor de água na fase móvel sobre a retenção dos compostos. Condições de análise: fase móvel, ACN:H<sub>2</sub>O. Vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm.



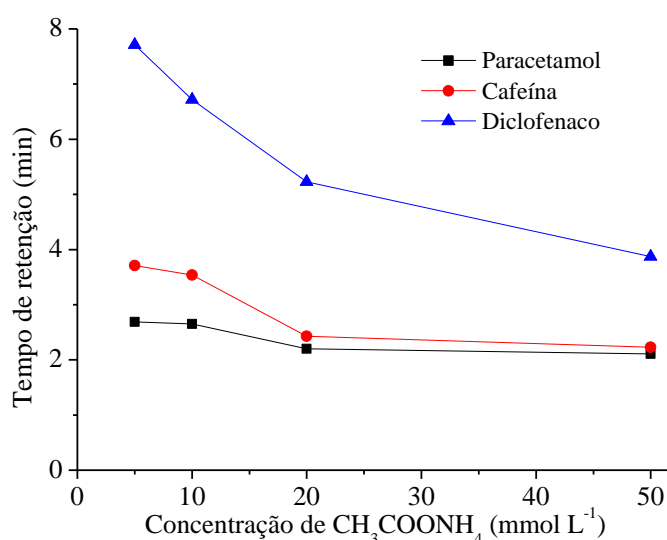
Como pode ser observado na Figura 23, de 75 a 100% de volume de água na fase móvel, apenas o diclofenaco de sódio apresentou uma forte tendência de aumento na retenção com o aumento do componente aquoso. Nesta condição de análise, em pH neutro, o diclofenaco de sódio apresenta carga, podendo interagir eletrostaticamente com os grupos silanóis residuais da sílica, que estão desprotonados com carga, resultando em um alto tempo de retenção.

De 75 a 90% de água na fase móvel, a cafeína e o paracetamol tiveram retenção praticamente constante, enquanto que em condições de fase móvel com mais 90% de água, apresentaram um ligeiro aumento de retenção na fase Si(PEO), mostrando que as interações hidrofílicas com o material ocorrem quando a composição da fase móvel está aproximando do seu máximo de polaridade. Com o aumento do teor de água de 75 a 90%, a superfície da fase Si(PEO) foi saturada simultaneamente com acetonitrila e água, provocando mudanças na retenção dos compostos. Sob condição de alto teor de água na fase móvel (> 90%), uma pequena variação na composição de acetonitrila resulta em uma alteração mais significativa na retenção dos compostos. Esse comportamento confirma a potencialidade de uso da fase no modo de cromatografia líquida aquosa (PALC), que resulta em geração reduzida de resíduos orgânicos da CLAE.

#### 4.6.1.2 Efeito da concentração do sal na fase móvel

Neste estudo foi investigado o efeito de diferentes concentrações do aditivo acetato de amônio (5 a 50 mmol L<sup>-1</sup>) na retenção dos fármacos. Na Figura 24, está apresentado o gráfico dos tempos de retenção dos fármacos em função da concentração do CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> na fase móvel.

Figura 24. Efeito da concentração de sal na fase móvel sobre a retenção dos compostos. Condições de análise: fase móvel, ACN:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>. 0-4 min (1:99, v/v); 4-5 min (20:80, v/v); 5-10 min (20:80, v/v). Vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm.



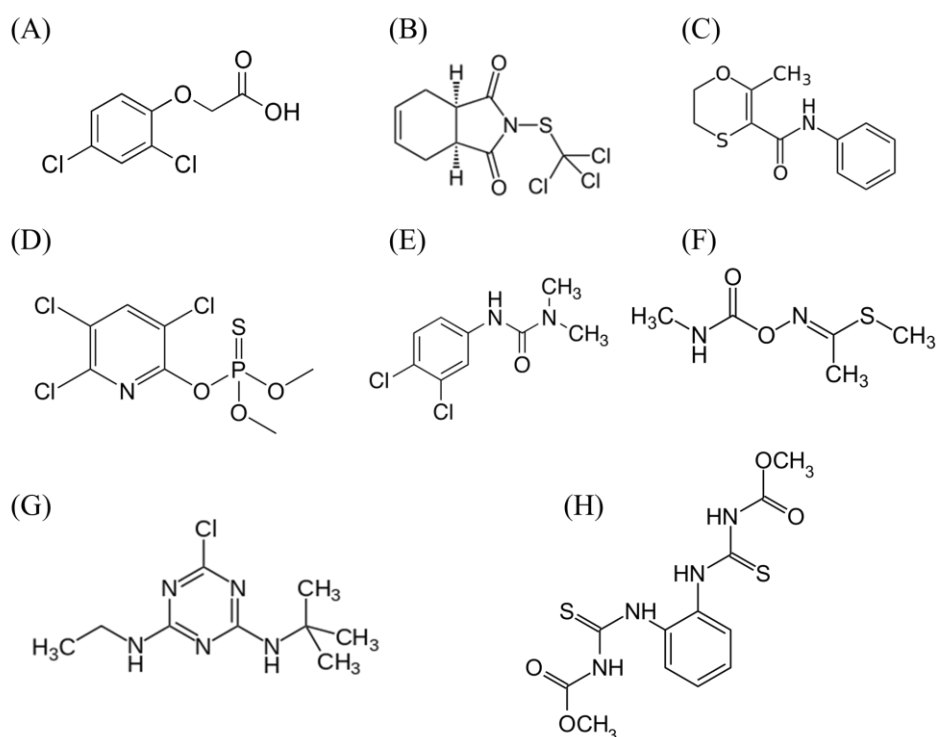
De acordo com a Figura 24, com o aumento da concentração do acetato de amônio na fase móvel observou-se uma ligeira diminuição do tempo de retenção apenas para o diclofenaco de sódio. De 5 a 20 mmol L<sup>-1</sup> de CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> na fase móvel, a cafeína e o paracetamol, apresentaram uma pequena diminuição do tempo de retenção, enquanto que, em concentrações maiores do sal, a retenção permaneceu praticamente inalterada. Com uma maior concentração de acetato de amônio na fase móvel, tem-se uma maior quantidade de íons de sal solvatados na camada de água, resultando em menores retenções dos solutos, ou seja, concentrações mais elevadas de sal aumenta a força de eluição da fase móvel, fazendo com que os compostos tenham menor interação com a fase estacionária. A partir dos resultados, verifica-se que em condições de concentrações mais baixas de acetato de amônio na fase móvel, tem-se a melhor condição para a separação dos compostos, pois os mesmos apresentam valores de retenção mais distinguíveis entre si. O uso de aditivo na fase móvel para separação no modo PALC é uma ferramenta muito

importante pois permite transferências de massas mais rápidas dos solutos entre as fases estacionária e móvel, promovendo separações mais eficientes.

#### 4.6.2 Separação de agrotóxicos

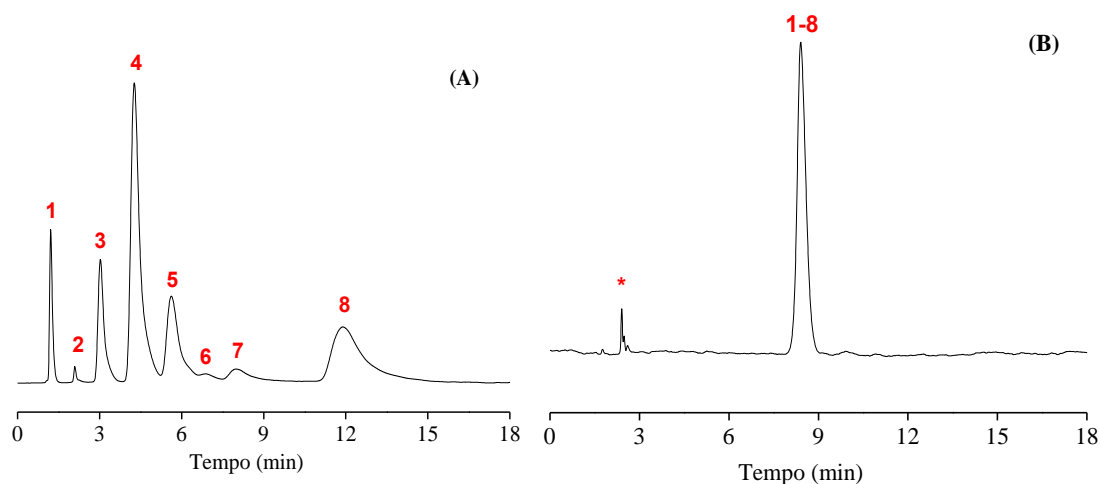
A aplicabilidade da fase estacionária Si(PEO) foi avaliada pela separação de oito compostos empregados como agrotóxicos e de retenção reduzida em fases comerciais convencionais à base de C<sub>18</sub> quimicamente ligado. Para efeito de comparação, a mesma mistura destes agrotóxicos foi separada por uma fase estacionária comercial C<sub>18</sub>, empregando as mesmas condições de análise da fase preparada no laboratório. A Figura 25 apresenta as estruturas químicas dos agrotóxicos separados pelas fases estacionárias.

Figura 25. Estrutura química dos agrotóxicos estudados: (A) 2,4-D; (B) Captan; (C) Carboxina; (D) Clorpirifós; (E) Diuron; (F) Metomil; (G) Terbutilazina; (H) Tiofanato metílico.



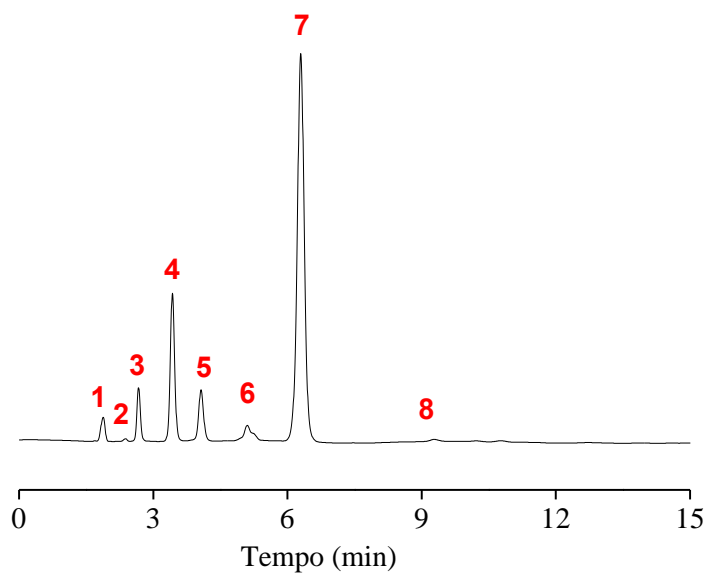
Os cromatogramas obtidos da separação destes compostos por ambas as fases, estão ilustrados na Figura 26.

Figura 26. Cromatograma da separação dos agrotóxicos (1) 2,4 D, (2) metomil, (3) tiofanato metílico, (4) carboxina, (5) captana, (6) diuron, (7) terbutilazina e (8) clorpirifós pelas fases: (A) Si(PEO)#2 e (B) C<sub>18</sub> comercial. Condições: MeOH:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v), 1,2 mL min<sup>-1</sup>, 25 °C, detecção UV a 230 nm.



Inicialmente, os agrotóxicos foram analisados individualmente para a confirmação da identidade de cada um dos picos. A partir dos cromatogramas ilustrados na Figura 26, verifica-se que a fase Si(PEO) possui capacidade de separar todos os agrotóxicos presentes na mistura empregando eluição no modo isocrático com fase móvel contendo 70% de componente aquoso e sem o uso de qualquer aditivo, enquanto que na fase comercial C<sub>18</sub>, sob as mesmas condições, apenas um dos compostos foi eluído. Para a separação dos agrotóxicos na fase comercial C<sub>18</sub> é necessário aumentar a força cromatográfica da fase móvel, como pode ser observado o cromatograma da Figura 27, para 80% do solvente orgânico na fase móvel para resultar em tempos de análises similares ao obtido na fase Si(PEO). A fase Si(PEO) mostra-se um material de separação bastante interessante para CLAE, que requer FM altamente aquosas sem a perda de qualidade da informação analítica quando comparada com materiais convencionais, visando reduzir de forma significativa o uso de solvente orgânico na fase móvel, contribuindo, assim, para o avanço da cromatografia líquida verde e, consequentemente, da química verde.

Figura 27. Cromatograma de separação de agrotóxicos pela coluna comercial C18. Compostos: (1) 2,4 D, (2) metomil, (3) tiofanato, (4) carboxina, (5) captana, (6) diurom, (7) terbutilazina e (8) clorpirifós. Condições de análise: MeOH: H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). Vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25 °C, detecção UV a 230 nm.



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas análises com a fase baseada na imobilização térmica do poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) (PEO) sobre partículas de sílica indicaram que esse material resulta em fases estacionárias com potencialidade para serem aplicadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Como uma de suas principais propriedades é a sua capacidade de reter substâncias polares mesmo em fases móveis altamente polares, o que indica sua potencialidade para uso no modo PALC. O principal atrativo destas fases é a simplicidade e facilidade de preparação, pois são necessários somente materiais e reagentes de fácil acesso e baixo custo.

As propriedades físico-químicas do PEO mostraram-se adequadas para sua aplicação como recobrimento polimérico de suportes cromatográficos. O polímero possui estrutura relativamente curta, conferindo ao suporte cromatográfico bom recobrimento de seus grupos ativos, apresentando alta taxa de transferência de massa e, conseqüentemente, proporcionando bom desempenho cromatográfico ao material. As propriedades físico-químicas da fase Si(PEO) permitiram verificar que o polímero foi imobilizado superficialmente no suporte cromatográfico. Com os resultados de separação cromatográfica dos compostos das misturas teste padrão avaliadas, observou-se que a fase Si(PEO) atua na modalidade de fase reversa, mas possui interação hidrofílica adequada para compostos polares, capaz de separá-los de forma rápida e eficiente. Essa característica está associada às propriedades da camada polimérica de PEO, em especial, ao grupo éter do polímero, que lhe confere um certo grau de polaridade.

Aplicando-se um planejamento fatorial fracionário foi possível otimizar as variáveis: solvente reacional, temperatura de imobilização, tempo de imobilização e carga polimérica de PEO, que influenciam na imobilização térmica do PEO sobre a sílica. Com o planejamento composto central otimizou-se os níveis das variáveis selecionadas. A partir dos resultados do planejamento, considerou-se que a fase Si(PEO) preparada em clorofórmio, com carga polimérica 50% m/m do PEO, temperatura e tempo de imobilização de 100°C e 8h, respectivamente, apresenta as condições ótimas das variáveis. Nestas condições, a fase Si(PEO) apresentou porcentagem de carbono imobilizado na superfície do suporte de sílica suficiente para a fase exibir um bom desempenho cromatográfico.

De acordo com os resultados da aplicabilidade da fase estacionária, a camada polimérica de PEO incorporada ao suporte de sílica pode ser considerada de baixa hidrofobicidade, necessitando, portanto, de fases móveis com composição mais aquosa nas separações de misturas de compostos polares, tais como fármacos e agrotóxicos. Apesar da fase Si(PEO) promover

separações do modo fase reversa, possui capacidade de separar compostos polares sob alta porcentagem de água na fase móvel, condição em que não são separados em uma coluna cromatográfica comercial C<sub>18</sub>. Este fato torna a fase Si(PEO) um material interessante para separações em cromatografia líquida aquosa (PALC), promovendo uma redução significativa de resíduos orgânicos ao final do processo cromatográfico, e assim, contribuindo para o avanço da cromatografia líquida verde, tão buscada recentemente pelos cromatografistas.

## REFERÊNCIAS

Alpert, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A*, v. 499, p. 177-196, 1990.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3)

Bahaabad, M.S.; Nassaj, E.T. Economical synthesis of nano alumina powder using an aqueous sol-gel method. *Materials Letters*, v. 62, p. 3364-3366, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.03.012>

Begnini, F.R.; Jardim, I.C.S.F. Preparation and characterization of a new microwave immobilized poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane stationary phase for reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1297, p. 113-122, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.070>

Bicker, J.; Fortuna, A.; Alves, G.; Falcão, A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples - A review. *Anal. Chim. Acta*, v. 768, p. 12-34, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.030>

Boersema, P.J.; Mohammed, S.; Heck, A.J.R. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 391, p. 151-159, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>

Borges, E.M.; Euerby, M.R.; Collins C.H. Characterization of a mixed-mode reversed-phase/cation-exchange stationary phase prepared by thermal immobilization of poly(dimethylsiloxane) onto the surface of silica. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 402, p. 2043-2045,

2012.

<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5674-z>

Bottoli, C.B.G.; Chaudhry, Z.F.; Fonseca, D.A.; Collins, K.E.; Collins, C.H.

Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 948, p. 121-128, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01316-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01316-4)

Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fischer, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. *J. Chromatogr. A*, v. 1030, p. 217-223, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.107>

Bruns, R.E; Scarminio, I.S. Como fazer experimentos. 2ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

Bui, N.T.H.; Verhage, J.J.; Irgum, K. Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 2965-2976, 2010.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201000154>

Buszewski, B.; Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 402, p. 231-247, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>

Camino, G.; Lomakim, S.M.; LAGEARD.M. Thermal polydimethylsiloxane degradation. Part 2. The degradation mechanisms. *Polymer*, v. 43, p. 2011-2015, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00785-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00785-6)

Carvalho G.O.; Silva C.G.A.; Faria, A.M. A New Stationary Phase for Analysis of Hydrophobic Compounds by RP-LC. *Chromatographia*, v. 79, p. 19-27, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10337-015-2993-9>

Chen, T.; Zhu, L.; Lu, H.; Son, G.; Li, Y.; Zhou, H.; Li, P.; Zhu, W.; Xu, H.; Shao, L. Preparation and application of covalently bonded polysaccharide-modified stationary phase for per aqueous liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, v. 964, p. 195-202, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.013>

Collins, C.H.; Silva, C.R.; Faria, A.M.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F. The search for more pH stable stationary phases for high performance liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 604-612, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000400004>

Collins, C.H; Braga, G.L; Bonato, P.S. Fundamentos de cromatografia, 4ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, p. 32-42, 2006.

Cruz, E.; Euerby, M.R.; Johnson, C.M.; Hackett, C.A. Chromatographic classification of commercially available reversed-phase HPLC columns. *Chromatographia*, v. 44, p. 151-161, 1997.

<https://doi.org/10.1007/BF02466449>

Cubbon, S.; Bradbury, T.; Wilson, J.; Thomas-Oates, J. Hydrophilic Interaction Chromatography for Mass Spectrometric Metabonomic Studies of Urine. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 8911-8918, 2007.

<https://doi.org/10.1021/ac071008v>

Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C. Cromatografia um breve ensaio. *Quím. Nova Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998.

Dib, S.R.; Faria, A.M. Polyethyleneimine immobilized on silica endcapped with octadecyl groups as a stationary phase for RP-LC. *Chromatographia*, v. 77, n. 7-8, p. 533-541, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s10337-014-2649-1>

Dousa, M.; Brichac, J.; Gibala, P.; Lehnert, P. Rapid hydrophilic interaction chromatography determination of lysine in pharmaceutical preparations with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 54, p. 972-978, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.026>

Engelhardt, H.; Clay, Ch.; SAAR, J. Reversed Phase Chromatography – the Mystery of Surface Silanols. *Chromatographia*, v. 62, n. 13S, p. S19-S29, 2005.

<https://doi.org/10.1365/s10337-005-0573-0>

Faria, A.M. Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

Faria, A.M.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 1385-1398, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000800002>

Faria, A.M.; Collins, K.E.; Collins, C.H. Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica. *J. Chromatogr. A*, v. 1156, p. 51-59, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.032>

Fountain, K.J.; Xu, J.; Diehl, D.M.; Morrison, D. Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 740-751, 2010.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200900660>

Gritti, F.; Pereira, A.D.S.; Sandra, P.; Guiochon, G. Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1217, p.683-688, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.004>

Grumbach, E.S.; Wagrowski-Diehl, D.M.; Mazzeo, J.R.; Alden, B.; Iraneta, P.C. Hydrophilic interaction chromatography using silica columns for the retention of polar analytes and enhanced ESI-MS sensitivity. *LC GC N. Am.*, v. 22, p. 1010-1023, 2004.

Guo, Y.; Gaiki, S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1218, 5920-5938, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.052>

Guo, Y.; Gaiki, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1074, p. 71-80, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>

Hemström, P.; Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, v. 29, p. 1784-1821, 2006.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>

Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1184, p. 474-503, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.075>

Jandera, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal. Chim. Acta*, v. 692, p. 1-25, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>

Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Anazawa, T.A. Radiation immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silica for use in HPLC: a uniform layer model. *J. Chromatogr. A*, v. 849, p. 299-307, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00555-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00555-5)

Jardim, I.C.S.F.; Collins, K.E.; Collins, C.H. Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. *Microchem. J.*, v. 77, p. 191-198, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2004.02.013>

Jardim, I.C.S.F.; Maldaner, L.; Lourenço, J.; Fioravanti, L.M.A.; Collins, C.H. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 2917-2929, 2010.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201000313>

Jin, G.; Guo, Z.; Zhang, F.; Xue, X.; Jin, Y.; Liang, X. Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, v. 76, p. 522-527, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.042>

Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N. Chromatographic characterization of silica-C18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 27, n. 12, p. 721-728, 1989.

<https://doi.org/10.1093/chromsci/27.12.721>

Kirkland, J.J. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr. A*, v. 1060, p. 9-21, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01892-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01892-8)

KLEIJNEN, J. P. C. Experimental design for sensitivity analysis, optimization, and validation of simulation models. *Handbook of Simulation*. John Wiley & Sons. cap. 6, p. 173-223, 1998.

<https://doi.org/10.1002/9780470172445.ch6>

Krupczynska, K.; Buszewski, B.; Jandera, P. Characterizing HPLC stationary phases, *Anal. Chem.*, v. 14, p. 226-234, 2004.

Kurganov, A.; Davankov, V.; Isaveja, T.; Unger, K.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, v. 660, p. 97-111, 1994.

[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85103-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85103-4)

Laças, F.M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). Sci. Chromatogr. v. 2, p. 49-57, 2010.

Liu, X.; Pohl, C. New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. J. Chromatogr. A, v. 1191, p. 83-89, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.012>

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, v. 1030, p. 225-229, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.029>

Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nystrom, J. PETTERSEN, R. Bergman, Experimental design and optimization. Chemom. Intel. Lab. Syst., v. 42, p. 3-40, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)

Maldaner, L.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Quim. Nova, v. 33, p. 1559-1568, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700024>

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

<https://doi.org/10.1002/jssc.200900574>

Mccalley, D.V. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1193, p. 85-91, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.007>

Mccalley, D.V.; Neue, U.D. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1192, p. 225-229, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.049>

Meyer, V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th ed. Chichester: Wiley, p. 426, 2010.

<https://doi.org/10.1002/9780470688427>

Park, Y.K.; Tadd, E.H.; Zubris, M.; Tannenbaum, R. Size-controlled synthesis of alumina nanoparticles from aluminum alkoxides. *Mater. Res. Bull.*, v. 40, p. 1506-1512, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2005.04.031>

Pereira, A. S.; David, F.; Vanhoenacker, G., Sandra, P. The acetonitrile shortage: Is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes. *J. Sep. Sci.*, v. 32, p. 2001-2007, 2009.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200900272>

Plotka, J.; Tobiszewski, M.; Sulej, A.M; Kupska, M.; Górecki, T.; Namiésnik, J. Green Chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1307, p. 1-20, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>

Prado, A.G.S.; Faria, E.A.; Padilha, P.M. Application and chemical modification of silica-gel obtained from sand. *Quím. Nova*, v. 28, p. 544-547, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300030>

Rojo, D.; Barbas, C.; Rupére, F.J. LC–MS metabolomics of polar compounds. *Bioanal.*, v. 4, p. 1235-1243, 2012.

<https://doi.org/10.4155/bio.12.100>

Sanseverino, A.M. Microondas em síntese orgânica. *Quím. Nova*, v. 25, p. 660-667, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400022>

Schiavon, M.A.; Redondo, S.U.A; Pina, S.R.O.; Yoshida, I.V.P. Investigation on kinetics of thermal decomposition in polysiloxane networks used as precursors of silicon oxycarbide glasses. *J. Non-Cryst. Solids*, v. 304, p. 92–100, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(02\)01009-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(02)01009-8)

Silva, C.G.A.; Collins, C.H. Improved chemical stabilities for end-capped high performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto metalized silicas. *J. Chromatogr. A*, v. 1260, p. 81-87, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.048>

Silva, C.G.A; Bottoli, C.B.G; Collins, C.H. Cromatografia por interações hidrofílicas (HILIC): estado da arte e aplicações. *Quím. Nova*, v. 39, n. 2, p. 210-220, 2016.

Silva, C.R.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; Airolidi, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím. Nova*, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000200017>

Snyder, L.R; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. Practical HPLC method development. 2<sup>a</sup> ed., New York: Wiley, 1997.

<https://doi.org/10.1002/9781118592014>

Sommella, E.; Cacciola, F.; Donato, P.; Dugo, P.; Campiglia, P.; Mondello, L. Development of an online capillary comprehensive 2D-LC system for the analysis of proteome samples. J. Sep. Sci., v. 35, p. 530-533, 2012.

<https://doi.org/10.1002/jssc.201100877>

Spitzer, M.; Sabadini, E.; Loh, W. Poly(ethylene glycol) or poly(ethylene oxide) magnitude of end-group contribution to the partitioning of ethylene oxide oligomers and polymers between water and organic phases. J. Braz. Chem. Soc., v. 13, p. 7-9, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000100002>

Swallow, A.J. Radiation chemistry – An introduction. London: Longman, 1973.

Tonhi, E. Preparação de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência recheadas com polissiloxanos (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

Tonhi, E.; Bachmann, S.; Albert, K.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, K.E.; Collins, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: I. Physical and chemical characterizations. J. Chromatogr. A, v. 948, p. 97-107, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01612-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01612-0)

Tonhi, E.; Collins, K.E.; Collins, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica. *J. Chromatogr. A*, v. 1075, p. 87-94, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.110>

Vigna, C.R.M. Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. 85 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

Weldu, G.K.; Song, H.; Van Schepdael, A.; Cabooter, D.; Adams, E. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 87, p. 142-154, 2013.

Wu, J.; Bicker, W.; Lindner, W. Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode. *J. Sep. Sci.*, v. 31, p. 1492-1503, 2008.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200800017>

Zhuravlev, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. *Colloids Surf., A*, v. 173, p. 1-38, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00556-2)

## ANEXO

### ARTIGOS CIENTÍFICOS

- 1- CARVALHO, G.O.; COLLINS, C.H.; FARIA, A.M. Self-Immobilization of Poly(methyltetradecylsiloxane) onto Metalized Silica Particles as Stationary Phases for HPLC. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, p. 1297-1304, **2016**.
- 2- CARVALHO G.O.; SILVA C.G.A.; FARIA, A.M. A New Stationary Phase for Analysis of Hydrophobic Compounds by RP-LC. *Chromatographia*, v. 79, p. 19-27, **2016**.