



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

**Poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE**

Dissertação de Mestrado

**ALLYSON LEANDRO RODRIGUES DOS SANTOS**

Orientador

**PROF. DR. ANIZIO MARCIO DE FARIA**

**ITUIUTABA**  
**FEVEREIRO DE 2019**

**Poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE**

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.

Candidato: **Allyson Leandro Rodrigues dos Santos**

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Área de concentração: Química Analítica

**ITUIUTABA  
FEVEREIRO DE 2019**

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

---

S237p Santos, Allyson Leandro Rodrigues dos, 1995-  
2019 Poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE [recurso eletrônico] / Allyson Leandro Rodrigues dos Santos. - 2019.

Orientador: Anizio Marcio de Faria.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.337>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Óxido de polietileno. 4. Sílica. I. Faria, Anizio Marcio de, 1977- (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

---

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



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 294/PPQUI.

DATA: 25/02/2019

DISCENTE: Allyson Leandro Rodrigues dos Santos

MATRÍCULA: 11712QMI015

TÍTULO DO TRABALHO: Poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE.

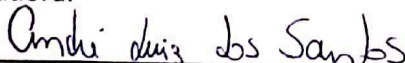
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química


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 nove horas do dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Auditório 2 do Bloco 1B no Campus do Pontal, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. André Luiz dos Santos, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Claudinei Alves da Silva, Universidade Federal de Jataí e Prof. Dr. 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 no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, 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 mantido.

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 3 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 25 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. André Luiz dos Santos

  
Prof. Dr. Claudinei Alves da Silva

  
Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Aos meus pais, Maria das Dores e Jorge, meus irmãos Fabrício e Georgiany, aos meus tios-pais Georgina e Marcos (in memoriam), e ao Dr. Anizio Marcio de Faria por toda confiança e pelos ensinamentos que fazem de mim o que sou hoje. E aos meus pequenos Tiago, Valentina e Murilo que fazem com que eu sempre tenha motivos para seguir a diante. A vocês, com muito amor, expresso o meu maior agradecimento!

Dedico!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não  
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar  
seria menor se lhe faltasse uma gota”

**Madre Tereza de Calcutá**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por toda força, sabedoria e coragem para que eu pudesse seguir todos os meus sonhos de acordo com os seus planos. Meu eterno agradecimento.

Aos meus pais Maria das Dores e Jorge por todo incentivo e confiança, por terem acreditado e sempre torcerem pelas minhas conquistas diárias. A todos os meus familiares que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui, em especial meus irmãos e minhas primas Andreia, Anna, Bruna e Danielly que, mesmo com a distância não deixam de me apoiar. E de forma muito especial os meus sobrinhos que a cada “Eu Te amo” fazem o meu dia mais feliz.

Ao Dr. Anizio Marcio de Faria, por toda dedicação em promover e compartilhar seu conhecimento. Meu eterno agradecimento pela oportunidade, você é o meu exemplo de pessoa e profissional.

Aos demais professores do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal – ICENP, em especial os professores André Santos, Elaine, Flash, Regina, Renata e Rosana por todas as discussões realizadas durante esse período que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFU pela oportunidade e espaço concedido. À Dr. Rosana pelas análises realizadas junto ao IQ/UFU.

Aos meus companheiros de casa, os que já passaram e aos que estão. Em especial ao Alan, Mariana, Thaís, Jessyka, Cinthia, Andressa, Mira e Ana Julia. A Dona Onília e a todos que estão na Merendinha zelando pelo meu bem estar.

Aos meus companheiros de grupo, agradeço pelo incentivo e troca de ideias. À Lorraine que é uma pessoa que formidável e que está sempre me apoiando. E aos guerreiros de laboratório com quem estou junto todos os dias Marcos, Andressa, Diele, Lauro, Giselle, Ana Maria, Carlão, Isabela, Kátia, Laís, Leticia, Ana Clara, Naiara, Mayara, Galete, Mateus, Paulo, Renan, Guilherme, Rafaela, Thais e tantos outros que fazem parte dos nossos momentos especiais.

À CAPES pela bolsa concedida e investimentos para que fosse possível a realização da pesquisa. À FINEP pela estrutura predial do laboratório (Chamada Pública MCT/Finep/CT-INFRA 01/2010) e pela instrumentação científica utilizados no desenvolvimento deste projeto (Chamada Pública MCTI/Finep/CT-INFRA 01/2013).

A todos vocês o meu muito obrigado.

## RESUMO

Compostos polares apresentam, normalmente, baixa retenção, resolução pobre e dificuldade de separação em cromatografia líquida de fase reversa e retenção irreversível na cromatografia líquida de fase normal, o que têm levado a diversas pesquisas em busca de soluções para esses problemas. Uma estratégia recentemente desenvolvida tem sido o uso de fase estacionárias (FE) moderadamente polares para separação desses compostos, demandando fases móveis ricas em água - cromatografia líquida em fase aquosa (PALC, *per-aqueous liquid chromatography*). Devido à baixa disponibilidade de materiais de fases estacionárias com estas características e o crescente aumento de moléculas polares nos mais diversos setores da indústria, este trabalho teve por objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a aplicabilidade de uma FE com características moderadamente hidrofílicas, hidroliticamente estável e seletiva a compostos polares. A FE foi preparada a partir da imobilização térmica do poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) (PEO) sobre suporte de sílica aluminizada (SiAl). A preparação das fases SiAl(PEO) foi otimizada, requerendo carga polimérica de 50 % (m/m) de PEO e 135 °C de temperatura de imobilização, para obter o melhor recobrimento das partículas de sílica aluminizada. As fases SiAl(PEO) foram caracterizadas morfológica e estruturalmente. A caracterização cromatográfica foi realizada a partir de misturas testes e protocolos já consolidados na caracterização de novas FE. Os resultados de caracterização morfológica indicaram que as fases SiAl(PEO) são constituídas de partículas esféricas de alta regularidade na distribuição do tamanho, sem formação de aglomerados, apesar da camada de nanopartículas de alumina. As partículas mesoporosas de SiAl(PEO) apresentaram área superficial específica de 374 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, poros cilíndricos de 0,98 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> e diâmetro de 10,5 nm. Pelos espectros de infravermelho foram identificados sinais característicos do PEO na fase estacionária, como o estiramento C-O-C em 1050 cm<sup>-1</sup>, bem como a diminuição da banda em 980 cm<sup>-1</sup> referente às vibrações dos grupos silanóis presentes na sílica. Na RMN de <sup>29</sup>Si observou-se que o PEO não forma ligação química com o suporte, apenas se adsorve fisicamente à sílica aluminizada. A fase SiAl(PEO) foi aplicada a misturas de agrotóxicos e fármacos polares, obtendo uma separação rápida com boa resolução para os picos empregando fases móveis altamente aquosas e alcalinas, reduzindo assim o uso de solventes orgânicos na FM. O material ainda se apresentou com elevada estabilidade química, muito superior a de fases comerciais quimicamente ligadas.

**Palavra Chave:** Fase estacionária, imobilização térmica, estabilidade, poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano), sílica aluminizada, cromatografia líquida de alta eficiência.



## ABSTRACT

Polar compounds usually exhibit low retention, poor resolution and difficulty of separation in reversed phase liquid chromatography and irreversible retention in normal phase liquid chromatography, which have led to several researches in search for solutions to these problems. A recently developed strategy for the efficient analysis of polar compounds has been the use of moderately polar stationary phases, demanding water-rich mobile phases – per-aqueous liquid chromatography (PALC). Due to the low availability of materials with these characteristics and the increasing of new polar molecules in the most diverse industrial areas, this work aimed to develop, characterize and evaluate the applicability of new stationary phase with moderate hydrophilic and chemically stable characteristics, selective to polar compounds. The stationary phase was prepared from the thermal immobilization of poly(ethylene oxide-co-dimethylsiloxane) (PEO) on aluminized silica (SiAl) support. The preparation of the SiAl(PEO) phases was optimized, using a factorial design, requiring a polymer load of 50 % (w/w) of PEO and 135 °C of immobilization temperature, to obtain the best PEO coating of aluminized silica particles. SiAl(PEO) phases were characterized morphologically, structurally and chromatographically by test mixtures already consolidated for the stationary phase characterization. The results of morphological characterization indicated that the SiAl(PEO) phases are composed of spherical particles of high regularity in the size distribution without agglomerations despite the deposition of a monolayer of alumina nanoparticles. The mesoporous particles of SiAl(PEO) presented 374 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> of surface area with cylindrical pores of 0.98 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> and diameter of 10.5 nm. Characteristic signals of the PEO, such as the C-O-C stretch at 1050 cm<sup>-1</sup>, were identified by infrared spectra, as well as the decrease of the band at 980 cm<sup>-1</sup> attributed to the vibrations of free silanols groups present on the silica surface. <sup>29</sup>Si NMR indicated that the PEO does not form a chemical bond with the support, therefore, it is physically adsorbed on the aluminized silica. SiAl(PEO) phase was applied to mixtures of pesticides and polar drugs, obtaining fast separation with good resolution for all peaks using highly aqueous or alkaline mobile phases, reducing the use of organic solvents in mobile phase. The material presented much higher chemical stability, than chemically bonded commercial phases.

**Keywords:** stationary phase, thermal immobilization, chemical stability, poly(ethylene oxide-co-dimethylsiloxane), aluminized silica, high-performance liquid chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. TIPOS DE GRUPOS SILANÓIS E LIGAÇÕES SILOXANO NA SUPERFÍCIE DA SÍLICA AMORFA.	18
FIGURA 2. TIPOS DE DEPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA NOS POROS DO SUPORTE CROMATOGRÁFICO, (A) RECOBRIMENTO DAS PAREDES DOS POROS OU (B) PREENCHIMENTO DO VOLUME DOS POROS.	24
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO POLI(ÓXIDO DE ETILENO-CO-DIMETILSILOXANO).	25
FIGURA 4. FLUXOGRAMA DO PROCESSO SOL-GEL INTRAMICELAR PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ALUMINA.	30
FIGURA 5. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SÍNTESE DO SUPORTE DE SÍLICA DE ALUMINIZADA.	30
FIGURA 6. FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CONTATO ENTRE O ADSORVENTE E O ADSORBATO.	31
FIGURA 7. FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO PARA O ESTUDO DE ADSORÇÃO DO VM NOS SUPORTES CROMATOGRÁFICOS.	32
FIGURA 8. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DA PREPARAÇÃO DA FASE SiAl(PEO) SORVIDA.	33
FIGURA 9. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DA PREPARAÇÃO DA FASE SiAl(PEO) IMOBILIZADA TERMICAMENTE.	33
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE ENCHIMENTO E ESVAZIAMENTO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA.	35
FIGURA 11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA EM % C PARA AS FASES SiAl(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM UM PLANEJAMENTO FATORIAL 3 <sup>2</sup> .	44
FIGURA 12. MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DO SUPORTE CROMATOGRÁFICO DE (A) SÍLICA (x7000), (B) ALUMINA (x10000) E (C) SÍLICA ALUMINIZADA (x10000).	46
FIGURA 13. ESPECTRO DE ENERGIA DISPERSIVA DE UMA REGIÃO ANALISADA DO SUPORTE DE SÍLICA ALUMINIZADA.	47
FIGURA 14. MICROGRAFIAS DA FASE SiAl(PEO) PREPARADAS (A) COM AMPLIAÇÃO DE 5kV E (B) 10 kV.	47
FIGURA 15. DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE VERDE DE MALAQUITA EM FUNÇÃO DO pH DA SOLUÇÃO.	49
FIGURA 16. CURVA ANALÍTICA DO VERDE DE MALAQUITA EM NaCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> , COM DETECÇÃO EM 617 nm.	49
FIGURA 17. ISORTERMA DE ADSORÇÃO DO VM NO SUPORTE DE (A) SÍLICA ALUMINIZADA E (B) SÍLICA.	50
FIGURA 18. CURVAS DE ADSORÇÃO DO VM SOBRE SÍLICA E SÍLICA ALUMINIZADA EM UMA FAIXA ESTREITA DE CONCENTRAÇÃO DE VM.	51

FIGURA 19. ISOTERMA DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE N <sub>2</sub> NA FASE ESTACIONÁRIA SIAL(PEO).	54
FIGURA 20. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO SUPORTE DE SÍLICA E SÍLICA ALUMINIZADA.	55
FIGURA 21. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA FASE SIAL(PEO) IMOBILIZADA TERMICAMENTE.	56
FIGURA 22. ESPECTRO DE RMN DE <sup>29</sup> SI (A) DO SUPORTE DE SÍLICA PURA, (B) SUPORTE DE SÍLICA ALUMINIZADA E (C) DA FASE ESTACIONÁRIA DE SIAL(PEO).	57
FIGURA 23. ESPÉCIES DE SILÍCIO PRESENTES NO SUPORTE DE SÍLICA ALUMINIZADA.	58
FIGURA 24. ESTRUTURA DOS COMPONENTES DA MISTURA TESTE (A) URACILA, (B) BENZONITRILA, (C) BENZENO, (D) NAFTALENO E (E) TOLUENO.	59
FIGURA 25. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA TESTE HIDROFÓBICA COMPOSTA DE (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO OBTIDA PELAS FASES SIAL(PEO). CONDIÇÕES DE ANÁLISE: MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90, v/v): (A) FASE #1; (B) FASE #2; (C) FASE #3; (D) FASE #4; FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40, v/v): (E) FASE #5; (F) FASE #6; (G) FASE #7; (H) FASE #8; (I) FASE #9. VAZÃO 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> ; DETECÇÃO UV A 254 NM.	60
FIGURA 26. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA EM NÚMERO DE PRATOS PARA AS FASES SIAL(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM UM PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3 <sup>2</sup> .	62
FIGURA 27. CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS DA SEPARAÇÃO SEQUENCIAL DA MISTURA TESTE PADRÃO PELA FASE SIAL(PEO) COM CARGA POLIMÉRICA DE 50 % E IMOBILIZADA A 135 °C . FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50, v/v. VAZÃO 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> , DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: 1- URACILA, 2- BENZONITRILA, 3- BENZENO, 4- TOLUENO E 5- NAFTALENO. ANÁLISES SUCESSIVAS.	63
FIGURA 28. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA TESTE HIDROFÓBICA COMPOSTA DE (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO OBTIDA PELAS FASES SIAL(PEO) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FASE MÓVEL ANÁLISE (A) MeOH:H <sub>2</sub> O (90:10, v/v); (B) MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v); (C) MeOH:H <sub>2</sub> O (70:30, v/v); (D) MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40, v/v); (E) MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50, v/v); (F) MeOH:H <sub>2</sub> O (40:60, v/v); (G) MeOH:H <sub>2</sub> O (30:70, v/v); (H) MeOH:H <sub>2</sub> O (20:80, v/v); (I) MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90, v/v);. VAZÃO 1,0 mL MIN <sup>-1</sup> ; DETECÇÃO UV A 254 NM.	64
FIGURA 29. CURVA DE VAN DEEMTER PARA FASE SIAL(PEO) #9 .	66
FIGURA 30. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA TESTE PELA FASE C <sub>18</sub> COMERCIAL. (A) FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20, v/v) E (B) FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) VAZÃO 0,4 mL MIN <sup>-1</sup> ; DETECÇÃO UV A 254 NM. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: 1- URACILA, 2- BENZONITRILA, 3- BENZENO, 4- TOLUENO E 5- NAFTALENO.	67
FIGURA 31. ESTRUTURA DOS COMPONENTES DAS MISTURAS DE TANAKA E COLABORADORES (A) BENZILAMINA, (B) BUTILBENZENO, (C) CAFEÍNA, (D) FENOL, (E) PENTILBENZENO, (F) TRIFENILENO, (G) O-TERFENILO E (H) URACILA.	68

- FIGURA 32. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA DE TANAKA I PELA FASE SIAL(PEO). (A) FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) E (B) FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) VAZÃO 0,4 mL MIN<sup>-1</sup>; DETECÇÃO UV A 254 NM. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS: 1- URACILA, 2- BUTILBENZENO, 3- PENTILBENZENO, 4- O-TERFENILO E 5- TRIFENILENO. \_\_\_\_ 70
- FIGURA 33. GRÁFICOS RADAR DAS PROPRIEDADES DE RETENÇÃO DAS FASES SIAL(PEO) OBTIDAS PELA SEPARAÇÃO DAS MISTURAS DE TANAKA PELAS FASES SIAL(PEO) (A) #3; (B) #4; (C) #5; (D) #6; (E) #7; (F) #8, (G) #9 E POR UMA FASE (H) C<sub>18</sub> COMERCIAL. \_\_\_\_\_ 72
- FIGURA 34. VARIAÇÃO DA (A) EFICIÊNCIA DE COLUNA E DO (B) FATOR DE RETENÇÃO PARA AS FASES SIAL(PEO) E C<sub>18</sub> COM A PASSAGEM CONTÍNUA DE FASE MÓVEL A PH 10. \_\_\_\_\_ 74
- FIGURA 35. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS: (A) CARBOXINA, (B) CLORPIRIFÓS, (C) DIFENOCONAZOL, (D) METOMIL, (E) TIOFANATO METÁLICO E (F) TERBUTILAZINA. \_\_\_\_\_ 76
- FIGURA 36. CROMATOGRAMA DE SEPARAÇÃO DA MISTURA DE AGROTÓXICOS PELA FASE SIAL(PEO). FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v), VAZÃO 0,8 mL MIN<sup>-1</sup>, DETECÇÃO UV A 230 NM. COMPOSTOS: 1- METOMIL, 2- TIOFANATO METÁLICO, 3- CARBOXINA, 4- TERBUTILAZINA, 5- DIFENOCONAZOL E 6- CLORPIRIFÓS. \_\_\_\_\_ 77
- FIGURA 37. CROMATOGRAMAS DE SEPARAÇÃO DA MISTURA DE AGROTÓXICOS PELAS FASES (A) SIAL(PEO) #9 E (B) C<sub>18</sub> COMERCIAL. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) DE 0-7 MIN; (60:40 v/v) DE 7-8 MIN; (60:40 v/v) DE 8-18 MIN; (30:70 v/v) DE 18-19 MIN, PERMANECENDO POR UM MINUTO A 30:70 v/v; VAZÃO DE 0,8 mL MIN<sup>-1</sup>, DETECÇÃO UV A 230 NM. COMPOSTOS: 1- METOMIL, 2- TIOFANATO METÁLICO, 3- CARBOXINA, 4- TERBUTILAZINA, 5- DIFENOCONAZOL E 6- CLORPIRIFÓS. \_\_\_\_\_ 78
- FIGURA 38. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS: (A) NORTRIPTILINA, (B) AMITRIPTILINA E (C) HIDROXIZINA. \_\_\_\_\_ 79
- FIGURA 39. CROMATOGRAMAS DE SEPARAÇÃO DA MISTURA DE ANTIDEPRESSIVOS PELAS FASES (A) SIAL(PEO) #9 E (B) C<sub>18</sub> COMERCIAL. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: (A) FASE MÓVEL MEOH:SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO A 25 MMOL L<sup>-1</sup> E PH 10 (70:30, v/v). (B) FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v). COMPOSTOS: 1- HIDROXIZINA, 2- NORTRIPTILINA E 3- AMITRIPTILINA. \_\_\_\_\_ 80
- FIGURA 40. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS: (A) BENZOCAÍNA, (B) LIDOCAÍNA E (C) TETRACAÍNA. \_\_\_\_\_ 81
- FIGURA 41. CROMATOGRAMAS DE SEPARAÇÃO DA MISTURA DE ANESTÉSICOS PELAS FASES (A) SIAL(PEO) #9 E (B) C<sub>18</sub> COMERCIAL. CONDIÇÕES DE ANÁLISE: (A) FASE MÓVEL MEOH:SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO A 25 MMOL L<sup>-1</sup> E PH 10 (40:60, v/v). (B) FASE MÓVEL MEOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v). COMPOSTOS: 1- TETRACAÍNA, 2- BENZOCAÍNA E 3- LIDOCAÍNA. \_ 82

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL $3^2$ , PARA OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DAS FASES SiAl(PEO).	34
TABELA 2. MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL $3^2$ PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DA FASE ESTACIONÁRIA SiAl(PEO).	34
TABELA 3. MISTURAS TESTES PADRÃO E CONDIÇÕES DE ANÁLISE DO PROTOCOLO DE TANAKA E COLABORADORES (KIMATA ET AL., 1989).	40
TABELA 4. PORCENTAGEM DE CARBONO (%C) PARA AS FASES SiAl(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM UM PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $3^2$ , EM QUE $x_1$ E $x_2$ REPRESENTAM OS VALORES CODIFICADOS PELAS EQUAÇÕES $x_1 = \%C - 3515$ E $x_2 = T - 12525$ .	43
TABELA 5. PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA, SÍLICA ALUMINIZADA E DA FASE ESTACIONÁRIA SiAl(PEO).	53
TABELA 6. PORCENTAGEM DE CARBONO (%C) E NÚMERO DE PRATOS (N) PARA AS FASES SiAl(PEO) PREPARADAS DE ACORDO COM UM PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO $3^2$ , EM QUE $x_1$ E $x_2$ REPRESENTAM OS VALORES CODIFICADOS PELAS EQUAÇÕES $x_1 = \%Carga - 3515$ E $x_2 = T - 12525$ .	61
TABELA 7. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA A COLUNA SiAl(PEO) #9, EMPREGANDO FASE MÓVEL MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40, v/v).	65
TABELA 8. PROPRIEDADES DE RETENÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDAS COM A SEPARAÇÃO DAS MISTURAS DE TANAKA PELAS FASES SiAl(PEO).	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% C	Porcentagem de carbono
$\alpha_{B/F \text{ pH } 2,70}$	Capacidade de troca iônica em meio ácido
$\alpha_{B/F \text{ pH } 7,60}$	Capacidade de troca iônica total
$\alpha_{C/P}$	Capacidade de ligação de hidrogênio
$\alpha_{CH2}$	Seletividade hidrofóbica
$\alpha_{T/O}$	Seletividade estérica
$^{29}\text{Si}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$
$A_{S10\%}$	Fator de assimetria a 10% de altura de pico
ASAP	Analisador de área superficial e porosidade
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FN	Cromatografia líquida de fase normal
CLAE-FR	Cromatografia líquida de fase reversa
CP-MAS	Rotação em ângulo mágico com polarização cruzada
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
$E_f$	Efeito de uma variável
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de interação hidrofílica)
ICENP	Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal
IQ/UFU	Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
$k_{PB}$	Fator de retenção do pentilbenzeno
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	Número de pratos
Na(AOT)	Bis-2-etilxilsulfossuccinato de sódio
PALC	<i>Per-aqueous liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida aquosa em fase aquosa)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PEO	Poli(óxido de etileno- <i>co</i> -dimetilsiloxano)

PMODS	Poli(metiloctadecilsiloxano)
PMOS	Poli(metiloctilsiloxano)
PMTDS	Poli(metiltetradecilsiloxano)
SiAl(PEO)	Poli(óxido de etileno- <i>co</i> -dimetilsiloxano) immobilizado termicamente sobre partículas de sílica aluminizada
T	Temperatura de imobilização
UV	Radiação ultravioleta
UV-vis	Radiações ultravioleta e visível
VM	Verde de malaquita

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA	16
1.2 SUPORTES CROMATOGRÁFICOS	17
1.2.1 <i>Suportes cromatográficos alternativos</i>	20
1.3 SUPORTES CROMATOGRÁFICOS A BASE DE SÍLICA MODIFICADOS COM ÓXIDO METÁLICO	21
1.4 FASES IMOBILIZADAS POR POLÍMEROS	22
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>27</b>
3.1 EQUIPAMENTOS	27
3.2 REAGENTES E SOLVENTES	27
3.2.1 <i>Agrotóxicos</i>	28
3.2.2 <i>Fármacos</i>	28
3.3 PREPARAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA SiAl(PEO)	29
3.3.1 <i>Ativação da sílica</i>	29
3.3.2 <i>Síntese do suporte cromatográfico de sílica aluminizada</i>	29
3.3.3 <i>Determinação de grupos Al-OH no suporte de sílica aluminizada</i>	31
3.3.4 <i>Preparação da fase estacionária SiAl(PEO) sorvida</i>	32
3.3.5 <i>Imobilização térmica do PEO sobre o suporte de sílica aluminizada</i>	33
3.3.6 <i>Extração do excesso de PEO não imobilizado</i>	34
3.4 ENCHIMENTO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA	35
3.5 PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL	36
3.6 CONDICIONAMENTO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA	36
3.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FASE SiAl(PEO)	37
3.7.1 <i>Análise elementar</i>	37
3.7.2 <i>Análise de área superficial e porosidade das partículas de SiAl(PEO)</i>	37
3.7.3 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	38
3.7.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva</i>	38
3.7.5 <i>Ressonância magnética nuclear de <sup>29</sup>Si</i>	39
3.8 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FASE SiAl(PEO)	39
3.8.1 <i>Mistura teste hidrofóbica</i>	39
3.8.2 <i>Mistura de Tanaka e colaboradores</i>	40
3.9 TESTE DE ESTABILIDADE	40
3.10 AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FASE SiAl(PEO)	41
3.10.1 <i>Separação de agrotóxicos</i>	41
3.10.2 <i>Separação de fármacos</i>	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>



4.1 SÍNTESE DA FASE ESTACIONÁRIA SiAl(PEO)	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DA FASE SiAl(PEO)	45
4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva	45
4.2.2 Determinação de grupo Al-OH na superfície do suporte de sílica aluminizada	48
4.2.3 Análise de área superficial e porosidade da fase SiAl(PEO)	52
4.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	54
4.2.5 Ressonância magnética nuclear de <sup>29</sup> Si das fases SiAl(PEO)	56
4.3 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FASE SiAl(PEO)	59
4.3.1 Análises cromatográficas da mistura-teste hidrofóbica	59
4.3.2 Análises cromatográficas do protocolo de Tanaka e colaboradores	67
4.4 TESTE DE ESTABILIDADE	74
4.5 APLICABILIDADE DA FASE SiAl(PEO)	76
4.4.1 Separação de agrotóxicos	76
4.4.2 Separação de fármacos	79
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as várias técnicas de separação que podem fornecer informações tanto qualitativas quanto quantitativas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais versátil, realizando separações em curto intervalo de tempo, com alta resolução e eficiência (TONHI *et al.*, 2002; DEGANI; CASS; VEIRA, 1998). Em muitos laboratórios, a CLAE se tornou uma técnica indispensável para a análise de amostras, determinação de constantes físicas e isolamento de componentes de misturas complexas. Atualmente, é uma técnica que se atribui um elevado interesse científico, comercial e nas indústrias químicas, sendo empregada na análise de compostos das mais diversas características, tais como: fármacos, medicamentos, alimentos, polímeros sintéticos, de importância ambiental, entre outras (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

Em CLAE, os compostos são separados de acordo com suas modalidades cromatográficas, a primeira desenvolvida foi a cromatografia líquida de fase normal (CLAE-FN). Nessa modalidade são analisados, predominantemente, compostos eletricamente neutros e a fase estacionária (FE) mais utilizada é a sílica ( $\text{SiO}_2$ , óxido de silício) enquanto na fase móvel (FM) são empregados solventes mais apolares como diclorometano e hexano (KAZOKA, 2002). Com a necessidade de análises de compostos das mais variadas polaridades e FM não cloradas foi então desenvolvida a modalidade da cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR), atualmente a principal modalidade da CLAE.

Na CLAE-FR a fase estacionária é constituída de uma camada fortemente apolar enquanto a fase móvel emprega eluentes misturados com a água (MEYER, 2010). A CLAE-FR concentra mais de 85 % das aplicações da cromatografia líquida, principalmente, por permitir a análise de substâncias, desde moderadamente polares até altamente apolares, com alta eficiência e em tempos relativamente curtos (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

A fase estacionária reversa apresenta algumas vantagens em relação à fase estacionária normal, podendo ser destacadas: a utilização de solventes não clorados e mais baratos como fases móveis que a CLAE-FN; a utilização de um componente aquoso na fase móvel, reduzindo sua toxicidade; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da composição da fase móvel; maior reprodutibilidade dos tempos de retenção; realização de eluições por gradiente, resultando em melhor separação e maior rapidez nas análises. (MEYER, 2010).

A ampla utilização da CLAE-FR está relacionada ao desenvolvimento de novas FE, cada vez mais seletivas e que promovem separações rápidas e eficientes para uma grande quantidade de compostos. As fases estacionárias tipicamente reversas se caracterizam pela

ligação química de cadeias orgânicas não polares, principalmente octadecilsilano (C<sub>18</sub>) e octilsilano (C<sub>8</sub>), sobre a superfície e poros de partículas de um suporte inorgânico, normalmente a sílica, de características polares. Na modalidade de fase reversa, portanto, as fases estacionárias são menos polares que as fases móveis, que contém água (MEYER, 2010; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; KIRKLAND, 2004; CLAESSENS; VAN STRATEN, 2004).

Apesar da ampla utilização, a CLAE-FR tem apresentado limitações que têm restringido seu campo de aplicação, principalmente em análise de compostos polares que não apresentam boa resolução ou separação adequada nas fases estacionárias disponíveis. Isto ocorre devido a substâncias com características hidrofílicas serem fracamente retidas em fases estacionárias hidrofóbicas, como aquelas tradicionais de fases reversas. Assim, tais substâncias apresentam tempo de eluição próximo ao tempo de eluição da fase móvel (popularmente denominado de tempo morto), de forma que as separações de outros solutos/interferentes polares não ocorram de forma satisfatória. Isto dificulta a quantificação, mesmo quando são empregadas fases móveis de baixa força cromatográfica como aquelas 100 % aquosas (PEREIRA *et al.*, 2009).

### **1.1 Cromatografia líquida de interação hidrofílica**

Uma nova modalidade da CLAE, a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) tem sido empregada de forma bem-sucedida e com eficiência na separação e quantificação de compostos polares, que normalmente não são separados no modo de fase reversa. O termo HILIC refere-se à afinidade pela água e foi empregado pela primeira vez por Alpert (1990), que utilizou fases estacionárias com substâncias hidrofílicas quimicamente ligadas à superfície da sílica no intuito de promover a separação de aminoácidos e outros compostos polares, obtendo eluições em ordem oposta àquelas obtidas em CLAE-FR (ALPERT, 1990). A HILIC tem emergido e se tornado cada vez mais útil para a determinação 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 pode ser caracterizada como uma modalidade da cromatografia líquida que emprega fases estacionárias da CLAE-FN em combinação com fases móveis típicas da CLAE-FR, contendo mais de 75 % de solvente orgânico misturado à água (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). A ordem de eluição é reversa a obtida em 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, a modalidade HILIC apresenta como principal desvantagem a utilização de uma alta porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, comumente a acetonitrila, que além de ser um solvente de alto custo é também considerado nocivo ao 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, caros e geradora de grandes volumes de resíduos perigosos para o ambiente de difícil recuperação (PLOTKA *et al.*, 2013).

Para reduzir o uso de solventes nocivos e promover análises no modo de uma cromatografia líquida menos tóxica e, conseqüentemente, proteger o meio ambiente dos riscos provocados pelos resíduos orgânicos da CLAE, um novo modo de cromatografia líquida tem sido proposto para a análise e separação de compostos polares, a cromatografia líquida aquosa (PALC, *per-aqueous liquid chromatography*) (PEREIRA *et al.* 2009; GRITTI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2017). A modalidade PALC pode ser considerada inversa à HILIC tanto na eluição dos compostos quanto na composição da fase móvel, pois na PALC compostos apolares são os mais retidos na fase estacionária e as fases móveis são constituídas por uma elevada porcentagem de água (70 % - 100 %) (PEREIRA *et al.* 2009).

## 1.2 Suportes Cromatográficos

As fases estacionárias para CLAE normalmente são compostas de um líquido estacionário sorvido, ligado ou imobilizado a um suporte cromatográfico. O material a ser utilizado como suporte, no entanto, necessita de alguns requisitos para que a FE apresente desempenho satisfatório nas separações cromatográficas. Um material ideal, para ser utilizado como suporte deve apresentar as seguintes características (MEYER, 2010):

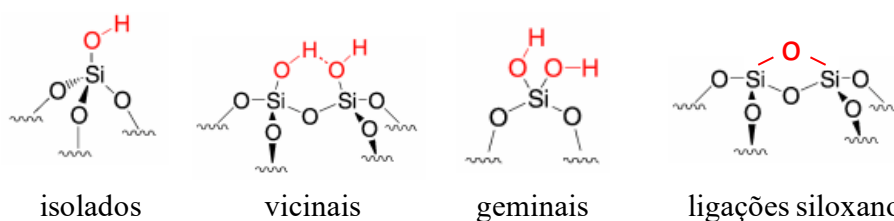
- ✓ Ser suficientemente poroso, permitindo que o líquido estacionário seja adsorvido nas paredes de seus poros;
- ✓ Diâmetro de poro entre 5 e 100 nm, pois poros muito estreitos tornam difícil a transferência de massas podendo ocorrer efeitos por exclusão de tamanho, enquanto que poros muito largos impedem a fixação do líquido estacionário por forças capilares e, desta forma, o líquido pode ser removido com a passagem da fase móvel;
- ✓ Alta concentração de grupos ativos em sua superfície para facilitar a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação do mesmo;

- ✓ Área superficial suficientemente grande, tipicamente maiores que  $10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ;
- ✓ Resistência mecânica elevada, para que o suporte seja capaz de resistir às altas pressões necessárias em CLAE-FR;
- ✓ 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). A sílica na sua forma amorfa e esférica é o material mais utilizado como suporte devido à sua alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez, eficiência elevada obtida nas separações cromatográficas de diversas substâncias e a facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos hidroxilas (silanóis) altamente reativos (BERTHOD, 1991; BUSZEWSKI *et al.*, 1998; VAN DER VOORT; VANSANT, 1996; ZHURAVLEV, 2000).

A sílica contém em sua superfície pelo menos três tipos distintos de grupos ativos (Figura 1), tais como silanóis isolados ou livres, vicinais e geminais que conferem ao material uma elevada acidez superficial, além das ligações siloxano (BERTHOD, 1991).

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



Fonte: Adaptado de SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014.

A facilidade de modificação das partículas de sílica foi extremamente importante para o desenvolvimento das fases do tipo siloxano, que marcaram o início do desenvolvimento da tecnologia de colunas cromatográficas para CLAE-FR. Estas fases são constituídas de agentes sililantes, tais como o octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) e o octilsilano ( $\text{C}_8$ ), ligados quimicamente aos grupos silanóis da sílica. A principal vantagem das fases do tipo siloxano foi a formação de ligações altamente estáveis do tipo  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$  entre os agentes sililantes e os grupos silanóis que conferiram uma maior estabilidade química às fases estacionárias (KIRKLAND, 2004).

As fases baseadas em sílica, por outro lado, tendem a serem limitadas em dois aspectos importantes. Um destes aspectos está relacionado à não homogeneidade da sua superfície, que apresenta diferentes tipos de grupos silanóis, os quais afetam a

funcionalização e, conseqüentemente, o mecanismo de retenção dos compostos a serem separados na CLAE (KIRKLAND, 2004). Os silanóis livres (-Si-OH) possuem características ácidas e podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas básicas (como uma grande maioria de fármacos, compostos bio-orgânicos, etc.) e adsorvê-las fortemente de forma reversível, prolongando o tempo de análise e prejudicando a sua detectabilidade ou, até mesmo, de forma irreversível. Além disso, quando ocorre uma forte adsorção de compostos básicos na superfície da fase estacionária, tem-se como resultado picos cromatográficos largos, assimétricos e com cauda, dificultando a quantificação dos compostos, além de poderem sobrepor parcial ou totalmente picos adjacentes, referentes aos solutos que eluem com tempos de retenção próximos. Quando as moléculas básicas são adsorvidas irreversivelmente na superfície da fase estacionária, os compostos podem restringir o transporte de massa, devido ao bloqueio de alguns sítios de interação normal e criar sítios ativos não específicos, afetando o desempenho da coluna e podendo levá-la a deterioração (TONHI *et al.*, 2002).

O outro aspecto limitante é a instabilidade da sílica e das fases estacionárias baseadas em sílica frente ao uso de fases móveis ácidas e alcalinas (PETRO; BEREK, 1993). Tipicamente, FE baseadas em sílica devem ser empregadas em condições de fase móvel dentro da faixa de pH de 2 a 8. Em fases móveis de  $\text{pH} < 2$ , ocorre hidrólise ácida das ligações Si-C entre a superfície da sílica e o material ligado quimicamente. Isto resulta em contínua perda da fase ligada concomitante à perda de retenção cromatográfica dos compostos. Em fases móveis com  $\text{pH} > 8$  ocorre rápida dissolução da sílica devido à exposição de parte do suporte ao contato com a fase móvel formando silicatos solúveis e, conseqüentemente, a clivagem da fase ligada do suporte. A dissolução da sílica leva a uma progressiva e rápida perda de desempenho cromatográfico, produzindo uma lacuna no topo da coluna e uma acentuada queda de pressão no sistema cromatográfico (NAWROCKI *et al.*, 2004). No entanto, FM ajustadas a pH fora da faixa de 2 a 8 são amplamente recomendadas para a CLAE-FR na análise de diversos compostos com características ácidas ou básicas, tais como os encontrados em muitas classes de agrotóxicos e de fármacos (FARIA, 2006).

Diante desses dois inconvenientes encontrados, o objetivo dos cromatografistas tem sido o desenvolvimento de materiais de suporte que ofereçam inércia química aos componentes das amostras (redução da atividade residual da superfície de sítios que não reagiram com os agentes modificadores na síntese das partículas da fase reversa), bem como estabilidade química em uma faixa mais ampla de pH (NAWROCKI *et al.*, 2004b).

### 1.2.1 Suportes cromatográficos alternativos

Para contornar a limitação do suporte de sílica e de fases estacionárias a base de sílica, uma alternativa encontrada foi a substituição de sílica por óxidos metálicos com estabilidade química em uma faixa de pH mais ampla. Dentre os primeiros materiais empregados como suportes alternativos à sílica, os óxidos de zircônio (zircônia), de titânio (titânia) e de alumínio (alumina) foram os mais estudados. A alumina é amplamente empregada como fase estacionária normal (FN) em cromatografia de coluna e tem como vantagem principal a boa estabilidade em uma faixa ampla de pH, nominalmente de 1 a 13, fato este que a tornou altamente atrativa como substituta à sílica (PESEK; MATYSKA, 2002).

A elevada estabilidade da alumina permite separações cromatográficas em valores de pH nos quais compostos básicos não se encontram na forma ionizada ( $\text{pH} > 9$ ), assim a separação é baseada somente no mecanismo de interação hidrofóbica, sem interferência do mecanismo de interação iônica. Para óxidos anfóteros como a alumina, as propriedades da superfície dependem fortemente do valor do pH do meio. O valor do pH no qual a carga líquida de uma superfície é zero é conhecido como ponto isoelétrico (PI). O PI da alumina é de 8,23 e a carga da alumina varia quando se vai de pH 7 a 9, torna-se evidente que a superfície da alumina estará carregada positivamente em valores de  $\text{pH} < \text{PI}$  e negativamente carregada quando  $\text{pH} > \text{PI}$ . Sendo assim, o grau de polarização da superfície da alumina irá depender de valores de pH do meio (HODERN, 2004)

Algumas FE baseadas em alumina foram preparadas a partir da modificação química do suporte por reação de organossilanização ( $\text{C}_{18}$ ) ou pela cloração da superfície da alumina com cloreto de tionila seguida da reação com um composto organolítico para atuação no modo de fase reversa (PESEK; MATYSKA, 2002). As fases reversas a base de alumina permitiram a separação de compostos básicos sem o uso de reagente par iônico ou de supressão iônica, devido ao PI da alumina (KURGANOV *et al.*, 1996; HAKY; VEMULAPALLI; WIESERMAN, 1990; PESEK; SANDOVAL; SU, 1993).

Apesar das FE a base de alumina terem apresentado estabilidade numa faixa de pH mais ampla e propriedades de retenção similares às FE a base de sílica, a modificação da superfície da alumina foi menor que a da sílica, resultando na exposição de grupos Al-OH residuais com características anfóteras e, portanto, interagindo indesejavelmente tanto com compostos ácidos quanto básicos. Além disso, o baixo desempenho cromatográfico nas

separações obtido com FE a base de alumina aliado à disponibilidade comercial limitada de formato, tamanho e grau de porosidades das partículas de alumina contribuíram para a sua modesta difusão como suporte cromatográfico (JARONIEC C; JARONIEC M; KRUK, 1998).

Apesar das FE reversas baseadas em alumina apresentarem uma série de dificuldades com relação à modificação de sua superfície, associada à menor reatividade dos seus grupos hidroxilas superficiais (KURGANOV *et al.*, 1994), a alumina apresenta características morfológicas adequadas para finalidades cromatográficas e, portanto, é proposto neste trabalho a modificação da superfície da sílica com nanopartículas de alumina, através de uma deposição organizada na forma de uma única camada (DUN *et al.*, 2004, SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014).

### **1.3 Suportes cromatográficos a base de sílica modificados com óxido metálico**

Dentre os diversos modos de preparo das nanopartículas de alumina o método sol-gel tem se apresentado como o mais eficaz, pois produz partículas de alta pureza e grande área superficial que são requisitos básicos para materiais utilizados em CLAE. Entretanto, o grande inconveniente no preparo da alumina é o crescimento acelerado e desordenado, além da aglomeração das suas partículas devido à alta reatividade dos reagentes precursores do alumínio (MIRJALILI; HASMALIZA; ABDULLAH, 2010; PARIDA *et al.*, 2009). Para que o crescimento seja limitado e forme partículas com poucos nanômetros de diâmetro, todo processo de preparo das partículas deve ser conduzido em um ambiente de menor escala que restrinja o crescimento da partícula de alumina e evite a aglomeração. O preparo de nanopartículas no interior de micelas de surfactantes é uma opção que tem sido empregada no preparo de nanopartículas metálicas para finalidades catalíticas (RANA; PHILIP; RAJ, 2010; AKPOLAT *et al.*, 2015; JARAMILLO; PAUCAR; GARCÍA, 2014). Desta forma, as micelas de surfactantes funcionam como verdadeiros nano reatores, possibilitando a condução de reações químicas e, em especial, a síntese das nanopartículas de alumina no seu interior que possuem alguns poucos nanômetros de diâmetro. Além disso, o interior da micela de surfactante funciona como um molde para as nanopartículas.

O método utilizado para a deposição das partículas de alumina sobre as partículas de sílica cromatográfica deve garantir que o material final, sílica aluminizada, seja resistente às pressões e aos solventes, aquosos e orgânicos, empregados em CLAE. Um método empregado para incorporação de camadas de óxidos sobre a sílica, resultando em um



material com excelente estabilidade para a análise cromatográfica, é o método de deposição de camadas auto-organizadas de óxidos (AHMED; MYERS; ZHANG, 2004; GE *et al.*, 2010). Nesse método, independentemente da força de interação entre a alumina e a sílica, as partículas do suporte serão obtidas pela imobilização de um surfactante na superfície da sílica seguida da incorporação de nanopartículas de alumina no agente tensoativo e subsequente combustão da matéria orgânica. O material final obtido é constituído apenas das nanopartículas de alumina adsorvidas sobre a superfície de microesferas porosas de sílica (DUN *et al.*, 2004; GE *et al.*, 2006; SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014).

#### **1.4 Fases imobilizadas por polímeros**

Apesar da ampla utilização da CLAE-FR, as fases quimicamente ligadas possuem considerações estéricas que impossibilitam densas distribuições de cadeias alquílicas (C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>) no suporte de sílica. Aproximadamente 50 % de grupos silanóis permanecem sem reagir após a síntese de fases estacionárias quimicamente ligadas, resultando em metade da superfície do suporte exposta a interações indesejáveis com solutos e a própria fase móvel (ENGELHARDT; BLAY; SAAR, 2005). Uma possibilidade eficiente para contornar as limitações do recobrimento orgânico incompleto da superfície da sílica na preparação de fases estacionárias reversas é a imobilização de camadas orgânicas de polímeros pré-sintetizados sobre a superfície da sílica (JARDIM; COLLINS C; COLLINS K, 2004)

Fases estacionárias baseadas no recobrimento polimérico, principalmente na modalidade de fase reversa, possuem eficiências similares às fases quimicamente ligadas (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009). Neste processo, objetiva-se a formação de uma monocamada polimérica que englobe toda a superfície do suporte cromatográfico, protegendo os grupos ativos superficiais da interação com componentes da amostra e do contato com a fase móvel.

O objetivo de produzir fases estacionárias com polímeros recobertos sobre um suporte é combinar a resistência mecânica do óxido inorgânico com a seletividade e inércia química dos polímeros orgânicos (DUN *et al.*, 2004; GE *et al.*, 2006; DIB; FARIA, 2014). Outro fator a ser considerado é o econômico, pois o preço de um quilo dos polímeros mais empregados é muito menor que poucos mililitros dos reagentes organossilanizantes.

A seletividade da fase estacionária imobilizada por polímero é diretamente influenciada pela quantidade e tipo de grupos funcionais nas cadeias dos polímeros, pela espessura do filme polimérico e pela área superficial e estrutura de poros do suporte (TONHI

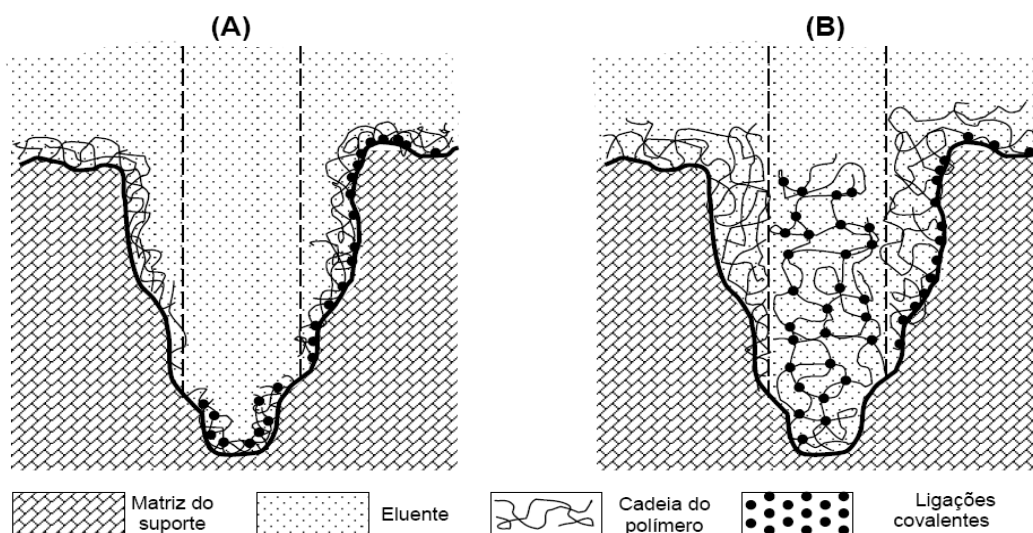
*et al.*, 2002). A ampla variedade de polímeros com distintas funcionalidades permite a aquisição de materiais de fases estacionárias com ampla faixa de seletividade, tornando possível o ajuste fino da seletividade ao problema analítico de separação (JARDIM *et al.*, 2010).

Os polissiloxanos são uma classe de polímeros muito empregados na preparação de fases estacionárias reversas para CLAE pelo método de recobrimento polimérico, 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). Os principais polissiloxanos empregados na preparação de fases estacionárias são: o poli(dimetilsiloxano) - PDMS (BORGES; EUERBY; COLLINS, 2012) (TONHI; COLLINS K; COLLINS C, 2005); o poli(metiloctilsiloxano) – PMOS (BOTTOLI *et al.*, 2004; VIGNA *et al.*, 2007); o poli(metiltetradecilsiloxano) - PMTDS (FARIA; COLLINS K; COLLINS C, 2007; BORGES; COLLINS, 2011) e poli(metiloctadecilsiloxano) - PMODS (SILVA; COLLINS, 2012). Os polissiloxanos apresentam ótima estabilidade térmica, resistência química e mecânica; e sua seletividade é definida pelos grupos substituintes existentes em suas estruturas (VIGNA, 2004). Novos polímeros com seletividades diferenciadas têm sido o objetivo de pesquisas para que as colunas cromatográficas resolvam separações de compostos polares sem necessitarem de alta porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, como ocorre no modo HILIC ou na separação de compostos hidrofóbicos como ocorrem com as FE baseadas nos polissiloxanos já preparadas (JARDIM *et al.*, 2010).

A forma mais simples de preparo das FE imobilizadas por polímeros é realizada pelo método de evaporação estática do solvente sem etapas posteriores de imobilização da camada polimérica no suporte cromatográfico (ANAZAWA; JARDIM, 1994). Para isto, o polímero é dissolvido em um solvente apropriado e, esta solução, é adicionada à matriz do óxido inorgânico utilizado como suporte cromatográfico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida. A sorção do polímero no suporte cromatográfico é um processo complexo governado por um balanço entre fatores energéticos e entrópicos que resulta em fases estacionárias com camadas poliméricas finas e reproduzíveis. Os grupos reativos superficiais do suporte cromatográfico agem como pontos de ancoragem para que os polímeros possam se ligar covalentemente ou apenas adsorver fisicamente à superfície do suporte (FARIA; JARDIM; COLLINS, 2009).

Basicamente, o polímero adsorvido pode se “moldar” de duas principais formas na superfície da sílica: formando uma película fina na superfície (Figura 2A) e ou então pode preencher o volume de poros totalmente (Figura 2B) (FARIA, 2006).

Figura 2. Tipos de deposição da solução polimérica nos poros do suporte cromatográfico, (A) recobrimento das paredes dos poros ou (B) preenchimento do volume dos poros.



Fonte: FARIA; JARDIM; COLLINS, 2009

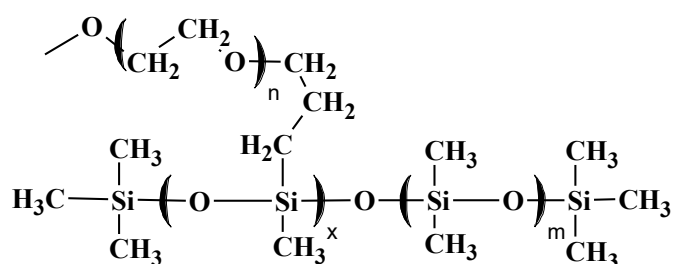
A fase estacionária recoberta com polímero ideal é aquela cuja a camada polimérica seja uniforme e relativamente fina, para que haja uma rápida transferência de massa do analito, uma vez que uma densa camada polimérica bloqueia os poros do suporte dificultando a difusão do analito através da FE.

A sorção do polímero sobre o suporte cromatográfico ocorre através de um fenômeno de auto-imobilização polimérica, pelo qual o polímero se distribui lentamente pela superfície e poros da partícula do suporte, inicialmente na forma de gotas, formando uma monocamada à temperatura ambiente que se espalha lentamente pela superfície do óxido inorgânico (BOTTOLI *et al.*, 2004). Como a cinética dessa adsorção é relativamente lenta, podendo levar até meses para gerar um material útil para separação cromatográfica (CARVALHO; COLLINS; FARIA, 2016), normalmente utiliza-se de um procedimento físico de imobilização para que ocorra uma aceleração dessa distribuição do polímero na superfície do suporte cromatográfico. Dentre os principais procedimentos de imobilização polimérica para a preparação de fases estacionárias para CLAE-FR pode-se destacar o tratamento térmico, que consiste na indução da ligação entre o polímero e os sítios ativos do suporte pelo aquecimento a seco, com tempo e temperatura controlados, do polímero fracamente

sorvido no suporte. 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).

Nesse trabalho, foi utilizado um copolímero pré-sintetizado, o poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano), que aqui será abreviado como PEO (Figura 3), para a preparação de fases estacionárias imobilizadas termicamente sobre partículas de sílica aluminizada, que apresentassem maior estabilidade química que fases reversas convencionais e com seletividade adequada para compostos polares. Este copolímero apresenta um bloco de polidimetilsiloxano (PDMS) que está presente na estrutura polimérica para garantir as propriedades de imobilização do polímero no suporte inorgânico. O PEO é constituído por um bloco de polióxido de etileno que será explorado neste trabalho como um grupamento que visa interagir de forma mais branda com compostos apolares e mais fortemente com substâncias polares, quando comparada à fases reversas tradicionais, devido à contribuição polar do grupo éter da estrutura química do polímero (SPITZER; SABADINI; LOW, 2002).

Figura 3. Estrutura química do copolímero poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano).



Fonte: próprio autor

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi preparar, caracterizar e aplicar uma nova fase estacionária para cromatografia líquida de alta eficiência de maior estabilidade química e com maior seletividade hidrofílica baseada na imobilização térmica do copolímero poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) sobre partículas de sílica aluminizada. Como objetivos secundários, este trabalho buscou a redução da geração de resíduos orgânicos na CLAE-FR a partir da utilização de fases móveis com menor teor de solvente orgânico, como metanol ou acetonitrila, para a separação dos compostos pela fase estacionária produzida. Desta forma, pretende-se contribuir com os esforços de tornar a CLAE uma técnica analítica mais limpa.

Alguns objetivos específicos foram delineados para alcançar os objetivos principais deste trabalho:

- ✓ Preparação do suporte de sílica aluminizada, seguindo procedimento realizado por Silveira, Dib e Faria (2014);
- ✓ Otimização do processo de imobilização térmica, em termos de carga polimérica e temperatura de imobilização, do copolímero PEO sobre partículas de sílica aluminizada – SiAl(PEO);
- ✓ Caracterização físico-química da fase SiAl(PEO);
- ✓ Avaliação cromatográfica da fase SiAl(PEO) através da separação de misturas testes padrão para caracterização de suas propriedades de retenção;
- ✓ Aplicação da fase preparada e otimizada na separação de compostos polares (agrotóxicos);
- ✓ Avaliação da estabilidade química da fase SiAl(PEO) e comparação com fases C<sub>18</sub> quimicamente ligadas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Equipamentos

- Analisador elementar, PerkinElmer, modelo 2400 (Norwalk, CT, EUA).
- 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®.
- Cromatógrafo a líquido Waters e2695, com sistema de detecção de arranjo de diodos modelo 2998 PDA, gerenciado pelo software Empower3®.
- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetro UV-vis lambda 25 PerkinElmer (Waltham, MA, EUA).
- Microscópio eletrônico de varredura TESCAN modelo Vega3 (Tóquio, Japão).

#### 3.2 Reagentes e Solventes

- Ácido nítrico, P.A. 65 % (Carlo Erba, Milão, Itália).
- 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).
- Fenol 99,5 % (Vetec).
- Hexano, (Tedia).
- Isooctano, P.A. 99% (Dinâmica, Diadema, São Paulo)
- Isopropóxido de alumínio, P.S. 99,5% (Vetec, Duque de Caxias, Brasil)
- Metanol grau HPLC, 99,5 % (Tedia).
- *o*-terfenilo 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).

- Surfactante Na(AOT) – bis-2-etilexilsulfossuccinato de sódio 99,9% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil)
- Tolueno grau espectroscópico (Tedia).
- Trifenileno 98 % (Sigma Aldrich).
- Uracila 99 % (Sigma Aldrich)

### **3.2.1 Agrotóxicos**

- Carboxina, padrão analítico, Pestanal®, 95,0%. Número CAS 5234-68-4;
- Clorpirifós, padrão analítico, Pestanal®, 97,0%. Número CAS 2921-88-2;
- Difenconazol, padrão analítico, Pestanal®, 99,0%. Número CAS 119446-68-3;
- 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.

### **3.2.2 Fármacos**

- Amitriptilina, Número CAS 0418712-1, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Benzocaína, Número CAS 0418712-3, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Hidroxizina, Número CAS 0417271-2, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Lidocaína, Número CAS 0418712-4, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Nortriptilina, Número CAS 0418712-2, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.
- Tetracaína, Número CAS 0418712-5, obtido em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG, como padrão secundário.

### 3.3 Preparação da fase estacionária SiAl(PEO)

#### 3.3.1 Ativação da sílica

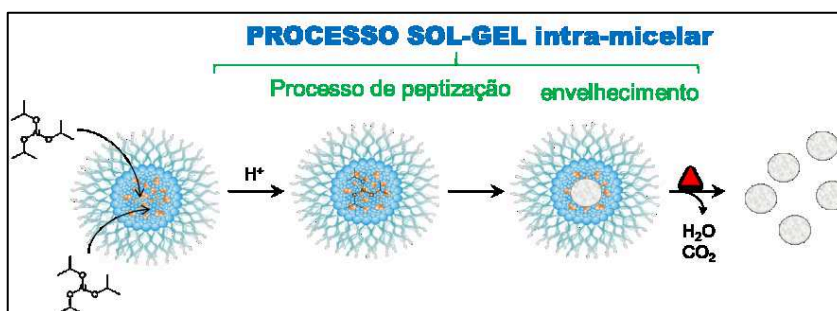
Inicialmente, realizou-se a ativação dos sítios ativos das partículas de sílica cromatográfica através da liberação de moléculas de água adsorvidas em sua superfície. Foram pesados aproximadamente 1,500 g de sílica cromatográfica de 5  $\mu\text{m}$  em um béquer e aquecidos a uma temperatura de 140 °C por 12 h com auxílio de uma mufla, o béquer foi coberto com papel alumínio com pequenos furos para liberação do vapor de água e proteção das partículas contra possíveis impurezas de dentro da mufla. Após esse período, o béquer contendo a sílica cromatográfica ativada foi transferido para um dessecador sob vácuo e deixado em repouso até alcançar a temperatura ambiente.

#### 3.3.2 Síntese do suporte cromatográfico de sílica aluminizada

Para preparação do suporte de sílica aluminizada, primeiramente foi necessária a síntese das nanopartículas de alumina através do processo sol-gel no interior de micelas reversas do surfactante bis-2-etilexilsulfossuccinato de sódio - Na(AOT), seguindo o procedimento estabelecido por Silveira, Dib e Faria (2014). Resumidamente, foi montado um sistema de refluxo contendo manta de aquecimento, balão de fundo redondo de duas bocas e condensador. Ao balão de fundo redondo foram adicionados 36,0 mL de isooctano, sob agitação magnética com aquecimento à temperatura de refluxo do isooctano (aproximadamente 110 °C). Após 10 min, foram adicionados 2,440 g do surfactante Na(AOT), sob agitação magnética constante. Após a dissolução completa do surfactante, foi adicionado 1,00 mL de água Milli-Q ao meio reacional. Em seguida, 0,250 g de isopropóxido de alumínio foram adicionados ao balão para a preparação das nanopartículas de alumina no interior das micelas do surfactante. O meio reacional foi fechado e mantido sob agitação constante por 2 h à temperatura de refluxo do isooctano. O processo sol-gel realizado para a preparação das nanopartículas de alumina está esquematizado na Figura 4.



Figura 4. Fluxograma do processo sol-gel intramicelar para síntese de nanopartículas de alumina.



Fonte: SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014.

Após 2 h de reação, foram adicionados ao balão de fundo redondo 0,90 mL de uma solução de ácido nítrico  $0,021 \text{ mol L}^{-1}$ , a fim de peptizar a solução, e 1,500 g de sílica previamente ativada. O meio racional foi mantido por 24 h sob temperatura de refluxo do isooctano com agitação constante. Após este período, o agitador com aquecimento foi desligado e o balão foi retirado do sistema e reservado até atingir a temperatura ambiente. A suspensão contendo a sílica aluminizada foi transferida para tubos de ensaio, os quais foram centrifugados a 2500 r.p.m. por 3 min, descartando-se o sobrenadante. O material sólido foi lavado com isooctano, isopropanol, metanol e água respectivamente, sempre descartando o sobrenadante, para remoção do solvente orgânico e excesso de reagente proveniente da síntese. O suporte de sílica aluminizada foi aquecido a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  com um auxílio de uma mufla, para evaporação da água residual por 12 horas. Após esse período, o suporte foi transferido para um cadinho de porcelana e calcinado a temperatura de  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h na mufla, o processo realizado é apresentado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma do processo de síntese do suporte de sílica de aluminizada.



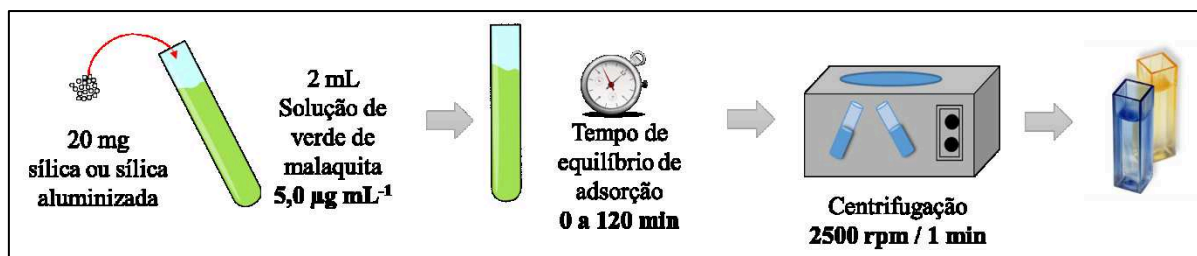
Fonte: SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014.

### 3.3.3 Determinação de grupos Al-OH no suporte de sílica aluminizada

A determinação de grupos Al-OH foi realizada através da adsorção do corante verde de malaquita (VM) no suporte de sílica e sílica aluminizada. O processo de adsorção do VM causa uma descoloração na solução, a qual pode ser quantificada através de medidas de absorvância realizada por um espectrofotômetro UV-Vis a 617 nm. A solução de VM foi preparada em solução de NaCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 5,00. Para quantificar o VM foi construída uma curva analítica a partir das concentrações de 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,500; 1,000; 2,000; 3,000; 4,000 e 5,000 mg L<sup>-1</sup> do corante em solução NaCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

Para determinar o tempo de contato entre o adsorvente e o adsorbato foi realizado um estudo com 20 mg de suporte cromatográfico (adsorvente) com uma solução de 5,000 mg L<sup>-1</sup> de VM (adsorbato), os tempos avaliados foram 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Para cada tempo estudado foi realizada uma leitura espectrofotométrica para quantificar a concentração de VM não adsorvida no suporte. O processo esquematizado está representado pela Figura 6.

Figura 6. Fluxograma do procedimento para determinação do tempo de contato entre o adsorvente e o adsorbato.



Fonte: próprio autor

Determinado o tempo de equilíbrio foi realizado o estudo de adsorção do VM no suporte de sílica e sílica aluminizada, as concentrações de VM utilizadas foram equivalentes às utilizadas para construção da curva analítica, e a massa de adsorbato foi de 20 mg para todo estudo. Após o tempo de contato entre adsorvente e adsorbato a solução foi agitada brandamente e uma alíquota foi retirada e medida no espectrofotômetro UV-Vis. O procedimento empregado nesta etapa está representado na Figura 7.

Figura 7. Fluxograma do procedimento para o estudo de adsorção do VM nos suportes cromatográficos.



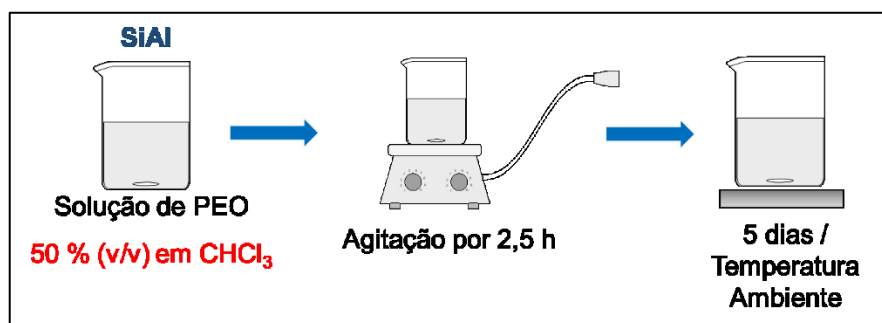
Fonte: próprio autor

### 3.3.4 Preparação da fase estacionária SiAl(PEO) sorvida

A preparação da fase sorvida, com o copolímero poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) - PEO - sobre o suporte de sílica aluminizada, foi realizada a partir do método de evaporação estática do solvente (JARDIM; COLLINS C; COLLINS K, 2004). Inicialmente, foi preparada uma solução do copolímero a 50 % v/v em clorofórmio, solvente no qual o copolímero teve melhor solubilidade. Em seguida, em um béquer de 25 mL adicionaram-se 10 mL de clorofórmio deixando sob agitação magnética branda. Lentamente, foi adicionada a quantidade adequada da solução 50 % v/v do copolímero, para obtenção de três diferentes proporções de carga polimérica (20, 35 e 50 % (m/m) do copolímero em relação a massa do suporte cromatográfico). A quantidade de copolímero foi adicionada com auxílio de uma pipeta, realizando uma transferência quantitativa do PEO com auxílio de clorofórmio. A solução foi deixada sob agitação constante por 10 min.

Após 10 min, adicionou-se 1,0 g de sílica aluminizada, previamente ativada a 140 °C por 12 h, à solução do PEO. A suspensão da sílica aluminizada na solução de PEO foi deixada sob agitação constante por 2 h 30 min. Em seguida, o béquer foi retirado da agitação e coberto com uma folha de papel alumínio previamente furada. O béquer foi deixado em repouso por aproximadamente 5 dias para que todo o solvente fosse evaporado à temperatura ambiente, obtendo-se assim a fase sorvida SiAl(PEO), representado pela Figura 8.

Figura 8. Fluxograma do processo da preparação da fase SiAl(PEO) sorvida.

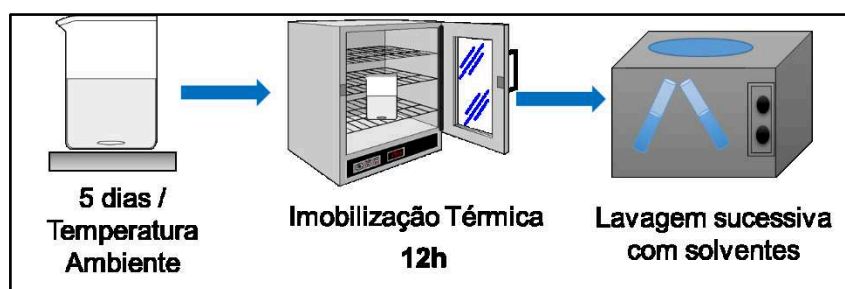


Fonte: próprio autor

### 3.3.5 Imobilização térmica do PEO sobre o suporte de sílica aluminizada

Após obtida a FE sorvida SiAl(PEO), completamente seca, o material foi levado para mufla e a temperatura foi ajustada para o valor desejado (100, 125 ou 150 °C) com tempo de aquecimento de 12 h, realizando o processo de imobilização térmica do copolímero sobre o suporte cromatográfico (Figura 9). O processo de imobilização visa aumentar a intensidade da interação do copolímero com o suporte cromatográfico, garantindo maior estabilidade durante a passagem contínua de fase móvel. Após essa etapa, obteve-se a fase SiAl(PEO) imobilizada termicamente.

Figura 9. Fluxograma do processo da preparação da fase SiAl(PEO) imobilizada termicamente.



Fonte: próprio autor

Para otimizar o processo de preparação da fase estacionária SiAl(PEO) sob diferentes condições de temperatura e carga polimérica foi utilizado um planejamento fatorial  $3^2$ , avaliando 2 variáveis (temperatura e carga polimérica) em três níveis, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial  $3^2$ , para otimização do preparo das fases SiAl(PEO).

	Variáveis	Nível (-)	Nível (0)	Nível (+)
1	Temperatura (°C)	100	125	150
2	Carga polimérica (% m/m)	20	35	50

O planejamento fatorial possibilita avaliar os efeitos da temperatura e carga de PEO e as interações entre si na preparação da fase SiAl(PEO), dentro dos níveis investigados, realizando apenas 9 experimentos com combinação entre todos os níveis e variáveis.

Na Tabela 2 é apresentada a matriz do planejamento experimental aplicado na preparação da fase SiAl(PEO), na qual é apresentada todas as combinações possíveis entre os níveis de cada variável estudada.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial  $3^2$  para diferentes condições de preparo da fase estacionária SiAl(PEO).

Fases SiAl(PEO)	Valores codificados		Valores reais	
	Temperatura (°C)	Carga polimérica (% m/m)	Temperatura (°C)	Carga polimérica (% m/m)
#1	-	-	100	20
#2	-	0	100	35
#3	-	+	100	50
#4	0	-	125	20
#5	0	0	125	35
#6	0	+	125	50
#7	+	-	150	20
#8	+	0	150	35
#9	+	+	150	50

### 3.3.6 Extração do excesso de PEO não imobilizado

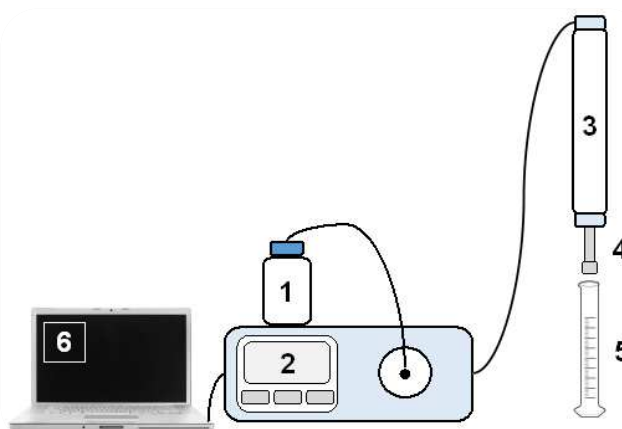
Após a etapa de imobilização do PEO sobre a sílica aluminizada em diferentes condições, parte do polímero que não ficou imobilizado na superfície do suporte foi removido. Para isso, a fase SiAl(PEO) foi submetida a lavagens sucessivas utilizando clorofórmio como solvente extrator. Nesta etapa, o material sólido foi dividido em tubos de ensaio em porções aproximadamente iguais. A cada tubo de ensaio foram adicionados 3 mL

de clorofórmio e agitado com vórtex por 30 s e submetida à centrifugação por 2 min a 2500 r.p.m., descartando o sobrenadante. O procedimento foi realizado em triplicata. O material sólido resultante foi levado a estufa e seco a 50 °C.

### 3.4 Enchimento da coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas foram preenchidas com a fase estacionária SiAl(PEO) pelo método de suspensão a alta pressão (MEYER, 2010). Para o enchimento de coluna cromatográfica com a fase SiAl(PEO) foi preparada uma suspensão em clorofórmio, garantindo a densidade e a viscosidade apropriada para formação da suspensão. A suspensão foi constituída em aproximadamente 1 g da fase SiAl(PEO) em 20 mL de clorofórmio. A suspensão foi agitada em vórtex por 1 min e deixada em banho ultrassom por 10 min, afim de impedir a aglomeração de partículas. Após esse período, a suspensão foi transferida para o sistema de enchimento de colunas, representado pela Figura 10.

*Figura 10. Representação esquemática do sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica.*



Fonte: próprio autor.

Como representado no esquema (Figura 10), o reservatório do solvente propulsor (1) foi preenchido com metanol previamente filtrado. Em seguida, a pressão da bomba (2) foi ajustada para um valor máximo de 9.000 psi, com vazão de solvente de 24 mL min<sup>-1</sup>. Ao reservatório de suspensão (3) foi acoplada a coluna cromatográfica (4) à sua extremidade. O volume do reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio) devidamente filtrado. Fechou-se a extremidade superior do reservatório da suspensão pelo qual foi adicionada a suspensão da fase SiAl(PEO). Com o sistema todo fechado, a bomba

foi ligada através de acionamento no software Quick-set Pump® (6), que bombeou metanol para o sistema de enchimento, impulsionando a fase SiAl(PEO) para o interior da coluna cromatográfica. A fase SiAl(PEO) ficou retida na coluna devido à presença de um filtro (diâmetro de poro de 2 µm) na extremidade inferior. O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de aproximadamente 100 mL de solvente, que foram recolhidos em uma proveta (5), colocada logo abaixo do sistema de enchimento, sendo esse volume equivalente a três vezes a capacidade do reservatório da suspensão. A manutenção da pressão durante todo o procedimento de enchimento da coluna foi necessária para produzir um recheio homogêneo e com boa compactação. Depois de terminado o enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal.

### **3.5 Preparação da fase móvel**

Os solventes constituintes da fase móvel (água, metanol e  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  0,020 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,60, pH 2,70 e pH 10) foram 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 µm de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados em frascos separados e deixados por 20 minutos em banho ultrassom, para serem desgaseificados. Após desgaseificados, os solventes foram dispostos nos reservatórios para fase móvel do sistema cromatográfico.

### **3.6 Condicionamento da coluna cromatográfica**

A coluna cromatográfica previamente recheada com a fase estacionária, foi conectada ao cromatógrafo a líquido, passando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 50:50 (v/v) por 2 h. Nessa etapa apenas uma das extremidades das colunas é acoplada no cromatógrafo a líquido, neste caso, na conexão das bombas cromatográficas, enquanto a outra extremidade é ligada diretamente ao descarte. Esse procedimento é de grande importância, já que resíduos das etapas anteriores podem ser eluídos junto com a fase móvel e essa medida evitaria o entupimento da cela de detecção do cromatógrafo.

### 3.7 Caracterização físico-química da fase SiAl(PEO)

#### 3.7.1 Análise elementar

Todas as fases estacionárias SiAl(PEO) produzidas foram submetidas à análise elementar para a determinação da percentagem de carbono após as etapas de imobilização térmica e remoção do polímero não imobilizado. O objetivo dessa medida foi avaliar o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico com o PEO. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco, cerca de 10 mg de fase estacionária, para converter os elementos da amostra em gases, como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>. Em seguida, os gases foram despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Foi empregado um analisador elementar PerkinElmer, modelo 2400 (Norwalk, CT, EUA) do Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

#### 3.7.2 Análise de área superficial e porosidade das partículas de SiAl(PEO)

As fases SiAl(PEO) foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. Antes das medidas, as amostras foram degaseificadas a 100 °C por 24 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (GREGG; SING, 1982) a pressões relativas (p/p<sub>0</sub>) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p<sub>0</sub> são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p<sub>0</sub> de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 1.

$$d_p = \frac{4 V_p}{S_{BET}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: d<sub>p</sub> = diâmetro médio de poros (nm); V<sub>p</sub> = volume de poros (mm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>) e S<sub>BET</sub> = área superficial específica (mm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) obtida pelo método BET.



Para estas medidas foi empregado um analisador de poros e área superficial específica ASAP da Micromeritics, modelo 2010 (Norcross, GA, EUA) no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

### ***3.7.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho***

As fases SiAl(PEO) imobilizadas sob diferentes condições experimentais foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Para análise das amostras foram empregadas pastilhas, na proporção 1:100 (m/m), de KBr sólido. A mistura foi prensada em um porta-amostras apropriado e este foi levado a um espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão). As medidas foram realizadas na faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e uma taxa de 32 varreduras por minuto. As medidas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do Curso de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (Química/ICENP).

### ***3.7.4 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva***

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a caracterização morfológica das fases SiAl(PEO), uma vez que a morfologia das partículas afeta o desempenho das FE no processo de separação, bem como o recheio das colunas cromatográficas. A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi empregada para determinação do teor de alumina presente no suporte cromatográfico. Nesta técnica, as partículas foram fixadas em porta-amostras de aço 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-amostras foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura TESCAN modelo Vega3 (Tóquio, Japão) com microsonda de raios-X. As imagens das partículas da fase SiAl(PEO) foram obtidas com diferentes ampliações. Estas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

### **3.7.5 Ressonância magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$**

As fases estacionárias SiAl(PEO) foram analisadas por ressonância magnética nuclear com polarização cruzada com rotação em um ângulo mágico (CP-MAS) no núcleo de  $^{29}\text{Si}$ . Estas análises foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície do suporte de sílica após a inserção das nanopartículas de alumina e a posterior imobilização térmica do PEO.

Para a obtenção dos espectros de  $^{29}\text{Si}$  RMN foi utilizado um rotor de  $\text{ZrO}_2$  com 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e uma frequência de rotação de 3500 Hz, na qual foram colocadas aproximadamente 300 mg das fases estacionárias. O tempo de contato de polarização cruzada foi de 5 ms e o tempo de intervalo de pulso de 1 s. Foram acumulados 1,5 decaimentos livres induzidos (FID – *Free Induction Decay*) com tempo de aquisição de 30 ms em número de pontos de 1 kb, que foram preenchidos até 8 kb, antes da transformada de Fourier. O alargamento da banda utilizado foi de 30 Hz e a largura espectral de aproximadamente 20 kHz. As medidas foram realizadas no IQ/Unicamp.

## **3.8 Caracterização cromatográfica da fase SiAl(PEO)**

### **3.8.1 Mistura teste hidrofóbica**

A avaliação cromatográfica das fases SiAl(PEO) foi realizada através da determinação dos parâmetros obtidos nas melhores condições de separação da mistura teste. A mistura teste é constituída de cinco compostos: benzeno, benzonitrila, naftaleno, tolueno e uracila, em que a ordem com que esses compostos são eluídos indica o comportamento/modalidade de separação das fases SiAl(PEO) produzidas. A mistura também foi utilizada para otimizar a composição e a vazão da fase móvel empregadas nas separações das fases SiAl(PEO). A detecção UV foi realizada a 254 nm, o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ , que corresponde ao volume da alça de amostragem utilizada nas análises. Os valores dos parâmetros cromatográficos foram obtidos pelo software Galaxie<sup>TM</sup> ou Empower3<sup>®</sup>.

### 3.8.2 Mistura de Tanaka e colaboradores

Afim de realizar uma caracterização cromatográfica mais completa das fases SiAl(PEO), foram analisadas as misturas do Protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989), pela qual são determinadas as propriedades de retenção de FE a partir da separação dos compostos que constituem cada uma das misturas do protocolo. Neste protocolo são analisadas quatro misturas distintas em diferentes condições de fase móvel. As misturas e suas respectivas fases móveis estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989).

Misturas	Compostos	Condições de análise	Propriedades medidas
MT-I	Uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, <i>o</i> -terfenilo e trifenileno	MeOH:H <sub>2</sub> O, 80:20 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C	Hidrofobicidade Seletividade hidrofóbica Seletividade estérica
MT-II	Uracila, cafeína e fenol	MeOH:H <sub>2</sub> O, 30:70 v/v; detecção UV a 254 nm, temp. 25 °C	Capacidade de ligação de hidrogênio
MT-III	Uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato pH 7,60, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C	Capacidade de troca iônica total
MT-IV	Uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato a pH 2,70, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C	Capacidade de troca iônica em meio ácido

### 3.9 Teste de Estabilidade

Para avaliar a estabilidade química da fase SiAl(PEO) utilizou-se de condições alcalinas de fase móvel MeOH:Solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10, 50:50 v/v, vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 45 °C e detecção UV em 254 nm. Primeiramente, foi realizada uma análise inicial para determinação dos parâmetros cromatográficos da fase para a mistura teste hidrofóbica. Logo após, a fase SiAl(PEO) foi submetida à degradação por 30 min e novamente foi realizada a medida dos parâmetros de retenção pela separação da mistura teste hidrofóbica. Esse procedimento foi repetido a cada 30 min por aproximadamente 24 h. Para o recheio da coluna de aço inox de 50 mm × 4 mm de d.i foi utilizada a fase SiAl(PEO) imobilizada a 150 °C com carga polimérica de 50 %.

Para esse teste foi utilizado uma mistura de uracila, tolueno e naftaleno. O teste também foi realizado com uma coluna comercial Si(C<sub>18</sub>) utilizando as mesmas condições de análise.

A estabilidade da fase SiAl(PEO) foi avaliada a partir de dois parâmetros cromatográfico sendo eles o número de pratos (N) e fator de retenção (K) para o composto mais retido, o naftaleno, em função do número de volume de coluna. O volume de coluna corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços interpartículas dentro do leito cromatográfico.

### **3.10 Avaliação da aplicabilidade da fase SiAl(PEO)**

#### ***3.10.1 Separação de agrotóxicos***

A fase SiAl(PEO) imobilizada termicamente a 150 °C com carga polimérica de 50 %, identificada como SiAl(PEO) #9, foi utilizada para avaliar a aplicabilidade da fase na separação de compostos polares, tais como uma mistura de agrotóxicos. A mistura de agrotóxicos é composta por carboxina, clorpirifós, difenoconazol, metomil, terbutilazina e tiofanato metílico. Inicialmente, a mistura de agrotóxicos foi analisada utilizando o modo de eluição isocrática com fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v), vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C com detecção UV em 230 nm. A mesma mistura foi submetida a eluição por gradiente sob mesmas vazão, temperatura e comprimento de onda de detecção, a fim de melhorar a separação dos compostos. A mistura de agrotóxicos foi analisada também em uma coluna 50 mm × 4 mm de d.i recheada com uma fase comercial C<sub>18</sub> quimicamente ligada com partículas de 5 µm, sob as mesmas condições de análise empregadas para a fase SiAl(PEO).

#### ***3.10.2 Separação de fármacos***

Para avaliar a potencialidade da fase estacionária SiAl(PEO) na separação de compostos básicos foram utilizadas duas classes de fármacos na forma de duas misturas. A primeira mistura corresponde a três antidepressivos Amitriptilina, Hidroxizina e Nortriptilina. Uma mistura desses compostos foi analisada por CLAE, utilizando uma coluna 150 mm × 3,6 mm de d.i recheada com a fase SiAl(PEO) #9 e fase móvel MeOH:solução tampão fosfato 25 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10, 70:30 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e detecção UV a 220 nm. A segunda mistura de compostos foi constituída de três anestésicos, sendo eles a Benzocaína, a Lidocaína e a Tetracaína. Essa mistura foi separada pela mesma

coluna anteriormente, empregando uma fase móvel MeOH:solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> pH 10, 40:60, v/v, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e detecção UV a 220 nm. A fim de comparação, as mesmas condições de análise utilizadas para avaliação da fase SiAl(PEO) foram empregadas para uma coluna comercial de 150 mm × 3,6 mm de d.i recheada uma fase Si(C<sub>18</sub>) quimicamente ligada, para preservar a coluna comercial a solução tampão foi substituída por água.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese da fase estacionária SiAl(PEO)

A fim de se obter um melhor desempenho das fases SiAl(PEO) e redução do número de experimentos foi aplicado um planejamento fatorial  $3^2$  de forma a viabilizar a otimização do processo de imobilização do polímero sobre o suporte de sílica aluminizada com um gasto reduzido de solventes e reagentes, sem perda de informações. Os fatores avaliados foram a temperatura de imobilização e a carga polimérica, utilizando como resposta a porcentagem de carbono, determinada por análise elementar. A matriz do planejamento de experimentos e os resultados obtidos para cada fase estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de carbono (%C) para as fases SiAl(PEO) preparadas de acordo com um planejamento fatorial fracionário  $3^2$ , em que  $x_1$  e  $x_2$  representam os valores codificados pelas

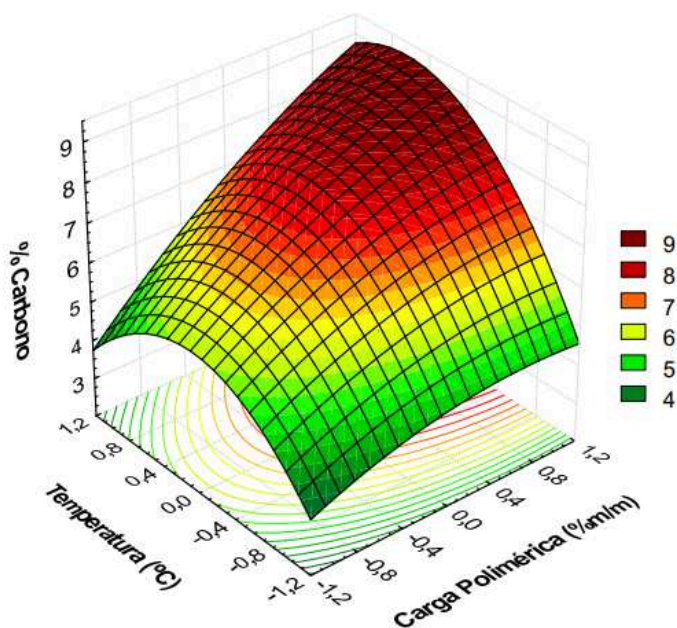
$$\text{equações } x_1 = \frac{\%Carga-35}{15} \text{ e } x_2 = \frac{T-125}{25}.$$

Fase	Carga (% m/m)	T (°C)	$x_1$	$x_2$	%C
#1	20	100	-1	-1	4,79
#2	35	100	0	-1	4,88
#3	50	100	+1	-1	5,43
#4	20	125	-1	0	5,19
#5	35	125	0	0	7,94
#6	50	125	+1	0	8,87
#7	20	150	-1	+1	5,14
#8	35	150	0	+1	7,11
#9	50	150	+1	+1	8,49

Através dos dados apresentados na Tabela 4 é possível mostrar que o PEO foi efetivamente imobilizado na superfície do suporte de sílica aluminizada, uma vez que todas as fases apresentaram um teor de carbono entre 4,79 e 8,87 % (m/m), sabidamente oriundo do polímero.

Para avaliar qual a melhor condição para imobilização polimérica, uma superfície de respostas de porcentagem de carbono foi construída utilizando a temperatura de imobilização e a carga polimérica como variáveis deste processo. A superfície de resposta para o experimento é apresentada na Figura 11.

Figura 11. Superfície de resposta em % C para as fases SiAl(PEO) preparadas de acordo com um planejamento fatorial  $3^2$ .



Considerando que uma maior porcentagem de carbono pode inferir em um melhor recobrimento do suporte cromatográfico pode-se dizer que, desta forma, haverá minimização das interações indesejadas entre os silanóis residuais do suporte de sílica aluminizada (não recobertos pela camada polimérica) e os componentes a serem separados. Os silanóis residuais, devido à sua acidez acentuada, interagem de forma a afetar o mecanismo de separação, uma vez que retêm muito fortemente moléculas básicas adsorvendo-as de forma irreversível. Portanto, os experimentos foram realizados no intuito de aumentar a quantidade de PEO imobilizado termicamente sobre as partículas de sílica aluminizada. De acordo com a superfície de respostas da Figura 11, a maior quantidade de polímero imobilizada ocorreu quando se empregou temperatura de imobilização de 135 °C e carga polimérica de 50 % (m/m) do PEO, referente aos valores codificados +0,4 e +1, respectivamente.

Considerando o teor de carbono obtido como resposta na Tabela 4, para cada fase SiAl(PEO) preparada foi calculado o efeito das variáveis a partir da diferença entre as médias dos resultados nos níveis menor e maior para cada variável, conforme a Equação 2.

$$E_f = \overline{\%C_{(+)}} - \overline{\%C_{(-)}} \quad \text{Equação 2}$$

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.

A aplicação da Equação 2 torna possível indicar que a carga polimérica apresenta efeito mais significativo no preparo da fase SiAl(PEO),  $E_f = +2,6$  versus  $+1,9$  da temperatura de imobilização. Os valores positivos indicam que quanto maior a carga polimérica de PEO na fase maior a imobilização polimérica e, conseqüentemente, maior a porcentagem de carbono no material.

Além das variáveis puras, também foi avaliada a interação entre as mesmas multiplicando os valores codificados e aplicando a Equação 2 para o cálculo do efeito de interação. O valor de efeito obtido foi de  $+1,4$ , menor que os efeitos individuais das variáveis, mostrando que as variáveis influenciam a resposta de forma univariada, ou que o efeito de interação entre as variáveis não é tão significativo quanto as variáveis individualmente, dentro da região investigada.

## **4.2 Caracterização morfológica e estrutural da fase SiAl(PEO)**

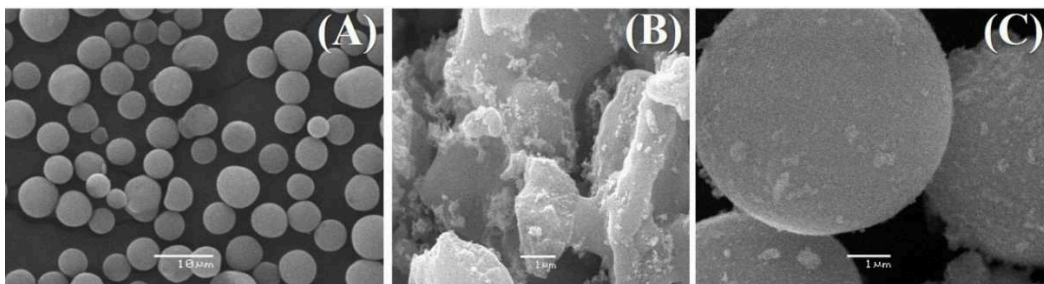
As propriedades morfológicas e estruturais das fases SiAl(PEO) foram avaliadas microscópica e espectroscopicamente. As técnicas empregadas para a caracterização das fases foram: microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de área superficial e porosidade (ASAP), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$  (RMN de  $^{29}\text{Si}$ ).

### ***4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva***

A microscopia eletrônica de varredura fornece importantes informações sobre a morfologia das partículas que são essenciais para o enchimento de colunas cromatográficas para a cromatografia líquida. Neste trabalho houve uma preocupação adicional com a morfologia das partículas uma vez que a presença de nanopartículas da alumina poderiam levar a aglomeração das partículas das fases estacionárias. As micrografias do suporte de sílica aluminizada, bem como da sílica e da alumina sintetizada neste trabalho são apresentadas na Figura 12.



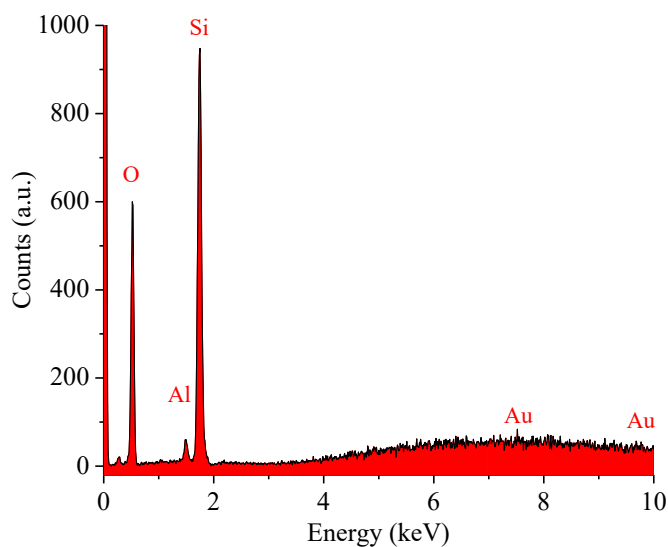
Figura 12. Micrografias eletrônicas de varredura do suporte cromatográfico de (A) sílica (x7000), (B) alumina (x10000) e (C) sílica aluminizada (x10000).



Pelas micrografias da Figura 12 observa-se que as partículas de alumina apresentaram dimensão nanométrica, como era de se esperar, já que o interior dos sistemas micelares do surfactante Na(AOT), empregado para a síntese da alumina, encontra-se em uma escala nanométrica (CAPEK, 2004). As nanopartículas de alumina não recobrem de forma uniforme a sílica, devido a irregularidade de distribuição dos sítios ativos superficiais da sílica, responsáveis pelo “ancoramento” das nanopartículas de alumina. A presença das partículas de alumina pode ser observada como pequenos pontos na superfície da sílica (Figura 12C). O formato esférico das partículas do suporte indica que as partículas de sílica cromatográfica (Figura 12A) não sofreram qualquer mudança significativa com a incorporação das nanopartículas de alumina. Este fato é vantajoso para finalidades cromatográficas, uma vez que a acomodação de partículas regulares no interior de colunas cilíndricas ocorre de forma mais compacta, uniformizando o leito cromatográfico.

O teor de alumínio no suporte de sílica aluminizada foi determinado por espectroscopia de energia dispersiva (EDS, *Energy Dispersive Spectroscopy*) a partir das micrografias eletrônicas de varredura da fase SiAl(PEO). Doze regiões distintas em três micrografias típicas das partículas de sílica aluminizada foram analisadas por EDS e os espectros obtidos foram empregados para a quantificação dos elementos presentes. A Figura 13 apresenta um espectro típico de uma das regiões analisadas para determinação do teor de alumina.

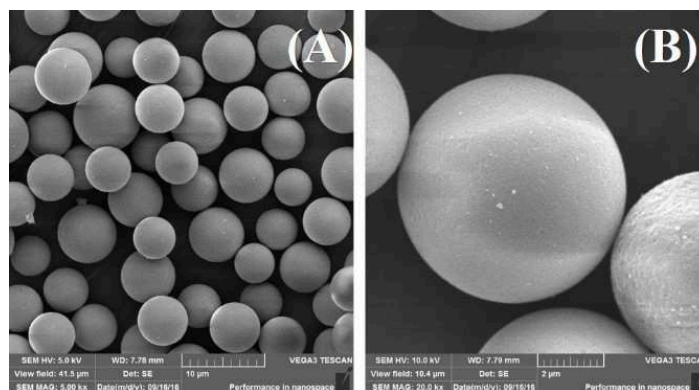
Figura 13. Espectro de energia dispersiva de uma região analisada do suporte de sílica aluminizada.



O espectro de energia dispersiva da Figura 13 indica a presença de alumínio no suporte de sílica aluminizada. A média do teor de alumínio, em porcentagem em massa, obtida das doze regiões distintas das micrografias das partículas de sílica aluminizada foi de  $1,61 \pm 0,14$  % m/m. Convertendo essa quantidade para o teor de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), a sílica aluminizada apresenta em média  $3,05 \pm 0,27$  % m/m de alumina. A pequena variação em torno da média do teor de alumina, indica uma distribuição regular de alumina em pequenas porções do material de suporte, mesmo havendo uma distribuição irregular na superfície da sílica.

Após a imobilização do PEO sobre o suporte de sílica aluminizada foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das partículas da fase SiAl(PEO), mostrada na Figura 14.

Figura 14. Micrografias da fase SiAl(PEO) preparadas (A) com ampliação de 5kv e (B) 10 kv.

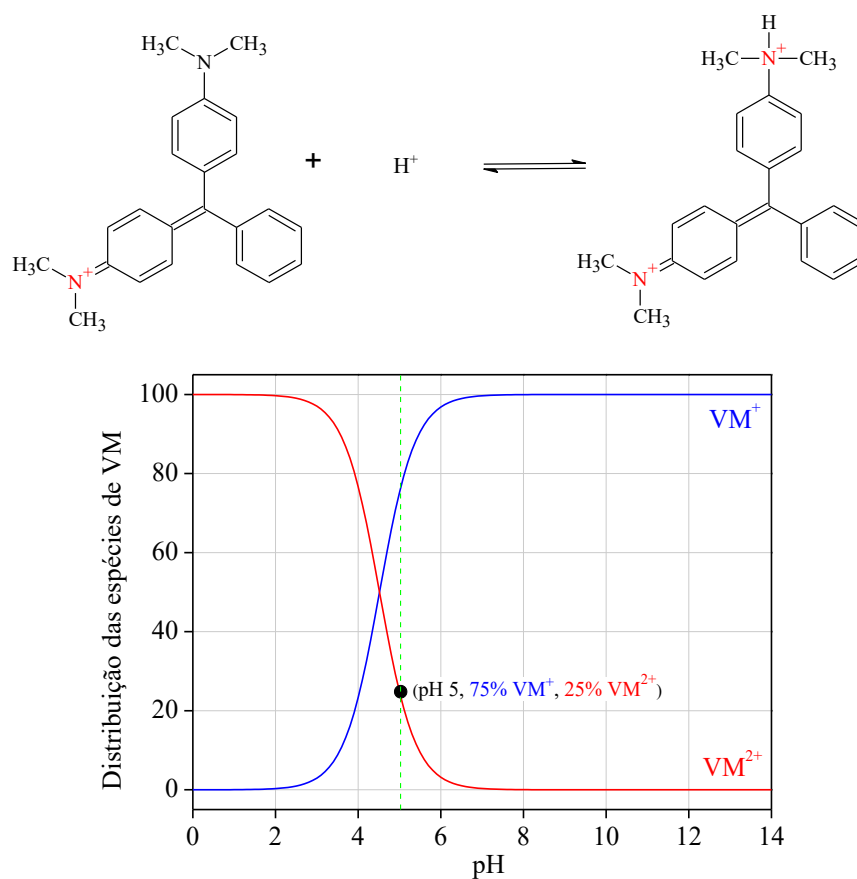


Pelas micrografias apresentadas na Figura 14 é possível observar que mesmo com adição da alumina e do PEO sobre as partículas de sílica não houve mudança significativa do formato esférico ou aglomeração das partículas da fase estacionária. Quanto maior a regularidade das partículas para o recheio das colunas cromatográficas, melhor o desempenho cromatográfico, devido à melhor compactação das partículas dentro da coluna.

#### ***4.2.2 Determinação de grupo Al-OH na superfície do suporte de sílica aluminizada***

A determinação de grupos Al-OH no suporte de sílica aluminizada foi realizada pelo estudo da interação diferenciada de verde de malaquita (VM) com as superfícies dos suportes de sílica e sílica aluminizada, com posterior análise das soluções adsorventes por espectroscopia de absorção na região visível. Neste estudo, o pH das soluções foi ajustado para 5, já que o ponto isoelétrico da alumina está em pH 8,23, enquanto o da sílica está em torno de pH 2,24. Em meio levemente ácido (pH 5), a alumina e o VM serão carregados positivamente (HAMEED; EL-KHAIARY, 2008), enquanto a sílica é carregada negativamente. Assim, a sílica aluminizada, nas regiões contendo Al-OH superficiais, irá repelir eletrostaticamente o VM, mantendo a solução esverdeada. Por outro lado, os sítios de sílica carregados negativamente atraem o VM em sua superfície, descolorindo a solução. Assim, quanto maior o teor de grupos Al-OH na sílica aluminizada, menor a quantidade de VM adsorvida em sua superfície e, por tanto, menor a descoloração da solução. É importante ressaltar que, embora o mecanismo de troca iônica estabelecido entre o adsorbato (VM) e os adsorventes (sílica e sílica aluminizada) seja predominante, outros processos de interação também podem ocorrer, principalmente sob diferentes concentrações de corantes em solução. A Figura 15 mostra o equilíbrio e a distribuição das espécies do VM de acordo com o pH da solução aquosa.

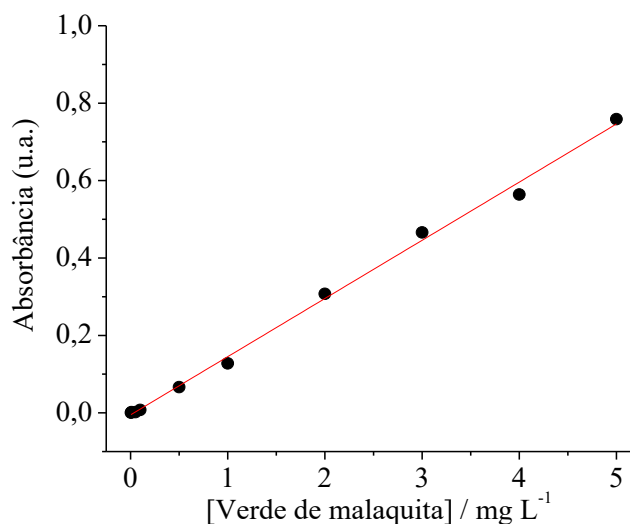
Figura 15. Distribuição das espécies de verde de malaquita em função do pH da solução.



Fonte: chemicalize.com

Para determinar a concentração de VM não adsorvida sobre o suporte de sílica e sílica aluminizada foi construída uma curva analítica para o VM na faixa de concentração de 0,005 a 5 mg L<sup>-1</sup> em NaCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, como apresentado pela Figura 16.

Figura 16. Curva analítica do verde de malaquita em NaCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, com detecção em 617 nm.



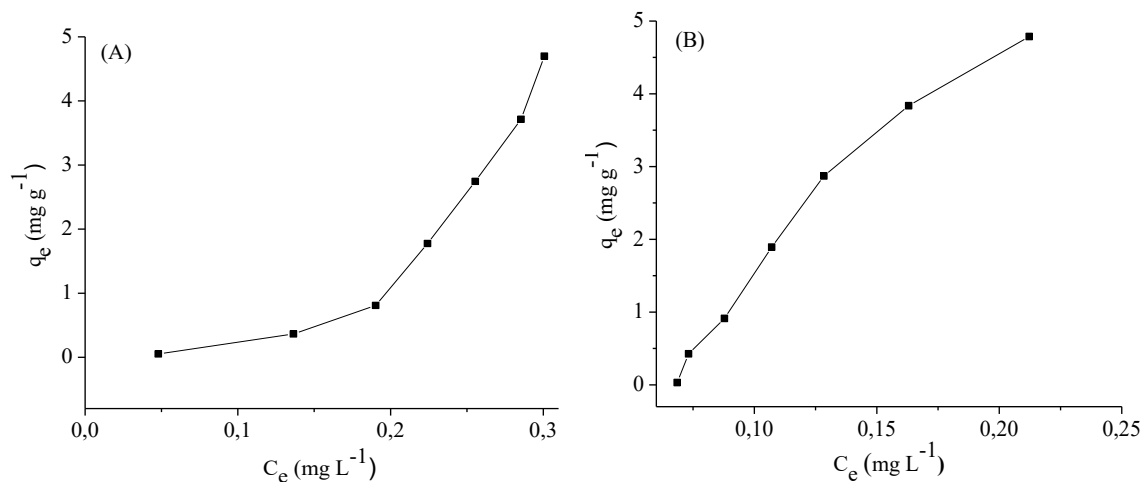
A partir dos pontos obtidos para curva analítica (Figura 16) foi realizada uma regressão linear dos dados de absorvância e concentração do VM, obtendo um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,997, e a equação linear:

$$A = 0,1503 [\text{VM}] - 0,0052$$

Sendo: A= absorvância (u.a); [VM] = concentração da solução de verde de malaquita ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Inicialmente, determinou-se o tempo de equilíbrio para a adsorção do VM sobre os suportes de sílica e sílica-aluminizada, sendo definido como 5 min o tempo necessário para a saturação da superfície dos suportes com moléculas de VM. Para determinar o teor de Al-OH na superfície da sílica aluminizada, construiu-se curvas de adsorção do VM na superfície da sílica aluminizada e da sílica pura, Figura 17.

Figura 17. Isoterma de adsorção do VM no suporte de (A) sílica aluminizada e (B) sílica.

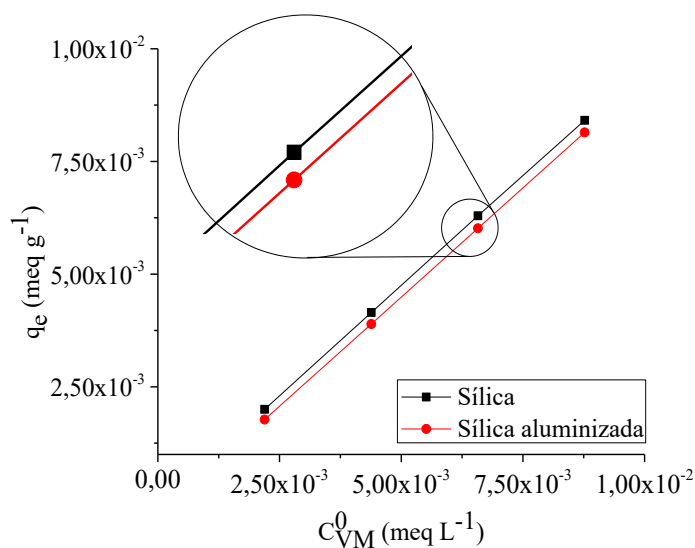


Pode-se observar que a adsorção de VM apresentou um comportamento distinto na sílica em comparação com o suporte de sílica aluminizada. Para adsorção de VM em sílica aluminizada a isoterma resultou em uma curvatura convexa, Figura 17A, o que implica em uma adsorção desfavorável do VM em sílica aluminizada, devido a sua baixa capacidade de remoção do adsorbato da solução em baixas concentrações. As curvas de adsorção convexas são consideradas isotermas do tipo S, nas quais as interações adsorvente-adsorbato são mais fracas que as interações adsorvente-adsorvente ou adsorvente-solvente. A adsorção de VM na sílica resultou em uma curva com curvatura côncava, Figura 17B. Esta condição implica

em uma adsorção favorável de quantidades relativamente altas de VM na superfície do adsorvente, mesmo em baixos níveis de concentração do adsorbato. Essa isoterma é considerada do tipo L, pois apresenta uma curvatura côncava devido à diminuição da disponibilidade de sítios ativos no adsorvente com o aumento da concentração do adsorbato (DIAS; CARMO, 2004).

Essa diferença entre o comportamento da adsorção de VM na sílica pura e na sílica aluminizada pode, portanto, estar associada à presença de sítios de Al-OH. Observou-se que, para o estudo de adsorção usando concentrações intermediárias de VM, condição em que o número de sítios ativos dos suportes não é muito maior que o de moléculas de VM e que o número de moléculas de VM não é significativamente maior que o de sítios ativos, há um comportamento linear entre a quantidade de VM adsorvida nos suportes e a concentração inicial de VM na solução. A Figura 18 mostra as curvas de adsorção obtidas para o VM na sílica e na sílica aluminizada nessas concentrações.

Figura 18. Curvas de adsorção do VM sobre sílica e sílica aluminizada em uma faixa estreita de concentração de VM.



De acordo com a Figura 18, as quantidades de VM adsorvidas em sílica e em sílica aluminizada em concentrações intermediárias de VM em solução exibem um comportamento linear. Além disso, a diferença entre a quantidade de VM adsorvida na sílica e na sílica aluminizada permanece constante dentro da faixa de concentrações avaliadas. Essa diferença pode estar relacionada, por aproximação, à inativação dos sítios OH da sílica ocupados pelos grupos Al-OH. A menor quantidade de VM adsorvido em sílica aluminizada pode, portanto, estar relacionada à repulsão eletrostática das moléculas de VM

(positivamente carregadas) pelos grupos Al-OH (positivamente carregados). Assim, de acordo com a Figura 18, a diferença média entre a quantidade de VM adsorvida nos suportes foi de  $0,122 \pm 0,003 \text{ mg g}^{-1}$  para as diferentes concentrações de VM em solução. Considerando uma massa molar de VM de  $329,458 \text{ g mol}^{-1}$ , o número médio de moles de VM que foi adsorvido na sílica pura foi de  $0,371 \pm 0,003 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ . Considerando também que a razão entre VM e Al-OH é de 1,25:1 (considerando que em pH 5, 25 % das espécies de VM estão como cátions duplamente carregados) na repulsão eletrostática entre o adsorvente e adsorbato, e que a área superficial de sílica aluminizada é  $204 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , a concentração de Al-OH na superfície de sílica aluminizada foi de  $2,28 \pm 0,02 \text{ nmol m}^{-2}$ . O valor obtido é significativamente baixo, o que implica que a sílica aluminizada tem uma baixa atividade de sítios Al-OH em sua superfície e poros, com a alumina sendo predominantemente incorporada na forma de partículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

É importante enfatizar que o conhecimento do conteúdo dos sítios de Al-OH na superfície de um suporte cromatográfico é um fator importante para a preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. A presença de um número muito elevado de sítios Al-OH pode levar também a uma maior dificuldade na modificação do suporte com grupos orgânicos para produzir fases estacionárias reversas ou a presença de sítios residuais anfóteros, que podem interagir indevidamente com solutos básicos e ácidos.

#### ***4.2.3 Análise de área superficial e porosidade da fase SiAl(PEO)***

A fase SiAl(PEO) foi analisada quanto às suas características de área superficial e porosidade a fim de avaliar propriedades morfológicas das partículas, bem como a modificação do suporte pelas partículas de alumina e pelo PEO. A área superficial foi obtida pelo método BET e a porosidade pelo método BJH, em que as propriedades são avaliadas através da adsorção e dessorção de  $\text{N}_2$  nos poros das partículas dentro de uma faixa de pressões relativas. Os resultados obtidos para a fase estacionária SiAl(PEO) foram comparados com os resultados obtidos para os suportes de sílica e de sílica aluminizada, ambos empregados no preparo das fases SiAl(PEO) e estão dispostos na Tabela 5.

*Tabela 5. Propriedades morfológicas das partículas de sílica, sílica aluminizada e da fase estacionária SiAl(PEO).*

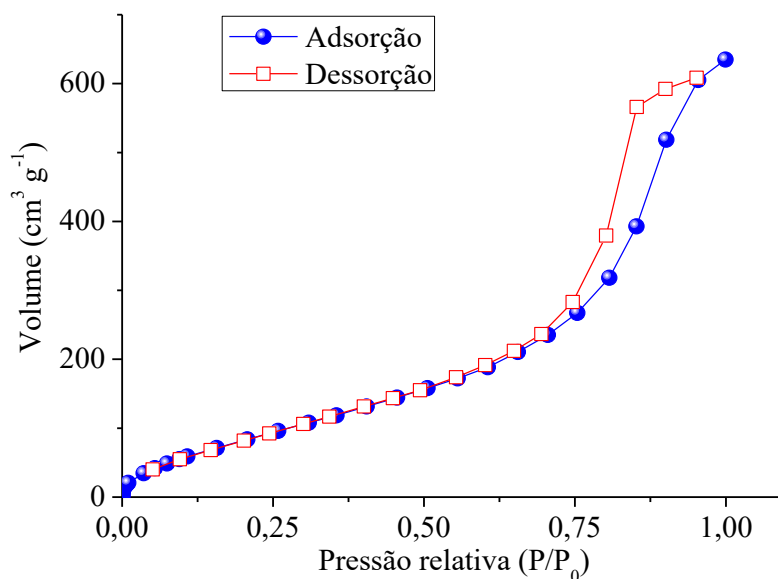
<b>Fase estacionária</b>	<b>Área superficial específica (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume de poros (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diâmetro de poros (nm)</b>
<b>Sílica</b>	546,2	1,67	12,25
<b>SiAl</b>	423,0	0,97	11,12
<b>SiAl(PEO)</b>	374,3	0,98	10,52

Os resultados da Tabela 5 mostram que o suporte de sílica aluminizada atende aos requisitos necessários para ser utilizado como suporte cromatográfico, uma vez que apresenta área superficial específica elevada (maior que 10 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) e alto grau de porosidade (MEYER, 2010). Quando comparados os resultados dos suportes cromatográficos, sílica e sílica aluminizada, há uma redução do volume de poros de 42 % mostrando que as nanopartículas de alumina se encontram inclusive nos poros das partículas de sílica. Quanto à área superficial houve uma redução de 23 % do suporte de sílica para o de sílica aluminizada. O mesmo acontece com diâmetros de poros, apesar de não ter sido tão significativo quanto o volume de poros e área superficial. A diminuição da área superficial específica não é considerada uma desvantagem, quando se leva em consideração as vantagens que a modificação da superfície da sílica com óxido metálico traz ao suporte de sílica aluminizada, como a maior resistência química em condições mais alcalinas (SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014). A imobilização do PEO sobre o suporte de sílica aluminizada levou a uma redução maior da área superficial das partículas, cerca de 32 %, se comparada à área superficial da sílica pura. No entanto, as propriedades de poros da fase SiAl(PEO) não tiveram alteração significativa após a imobilização do PEO, uma vez que a redução foi de apenas 5 % no diâmetro de poros. De uma forma geral, pode-se observar que a imobilização do PEO ocorre tanto na superfície do suporte quanto nos seus poros, porém sem resultar em uma obstrução total destes.

A determinação das propriedades de poros e área superficial específica das fases SiAl(PEO) foi realizada por meio de isoterma de adsorção de nitrogênio a -195,5 °C. A isoterma obtida é apresentada na Figura 19.



Figura 19. Isoterma de adsorção e dessorção de  $N_2$  na fase estacionária SiAl(PEO).

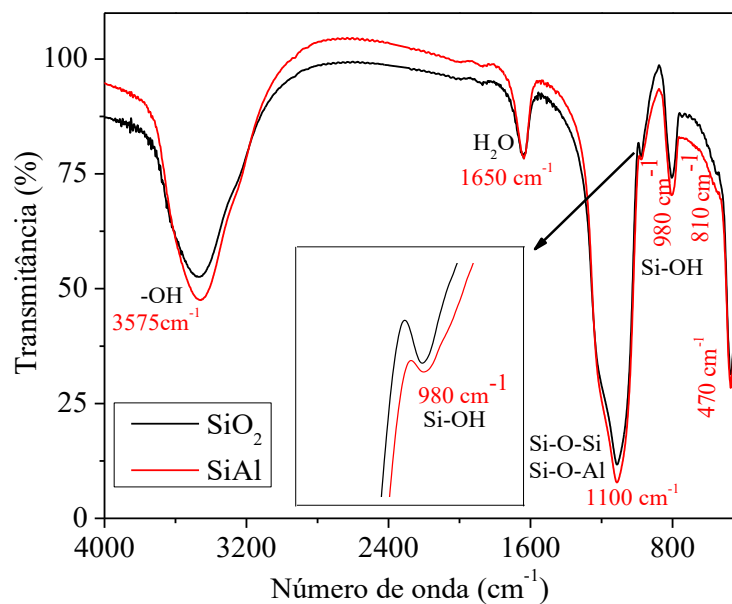


O perfil da isoterma obtida pela adsorção e dessorção de  $N_2$  na fase SiAl(PEO) é característico de isotermas do tipo IV. Nas isotermas do tipo IV são observados processos distintos de adsorção e dessorção de  $N_2$  na superfície e poros da fase SiAl(PEO) (GREGG & SING, 1982). O processo inferior (●) mostra a quantidade de gás adsorvida com o aumento da pressão relativa, enquanto que o processo superior (□) representa a quantidade de gás dessorvida no processo inverso. Esse tipo de isoterma é característico de materiais mesoporosos, com diâmetro de poros de 2 a 50 nm, confirmando os valores apresentados na Tabela 5. A não sobreposição das isotermas caracterizam uma histerese do tipo H1, o que define morfologicamente a fase SiAl(PEO) com poros regulares, abertos e uniformes de forma cilíndrica, característicos da sílica (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES; 2001), indicando que não há alteração significativa das propriedades de poros com a deposição das nanopartículas de alumina e a imobilização do PEO.

#### 4.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

As estruturas químicas dos suportes foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho a partir da caracterização dos principais grupos funcionais presentes no material. O espectro de absorção no infravermelho do suporte de sílica ( $SiO_2$ ) e sílica aluminizada (SiAl) estão apresentados na Figura 20.

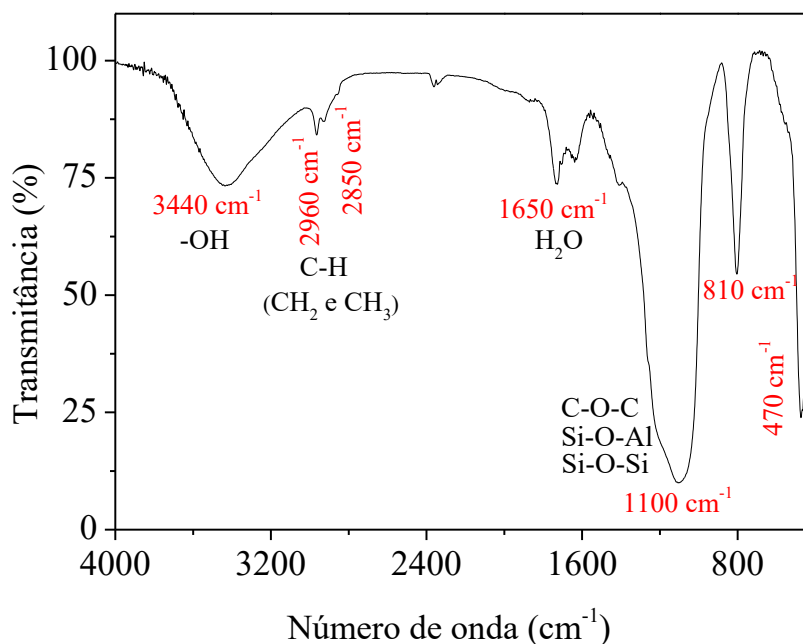
Figura 20. Espectro de absorção na região do infravermelho do suporte de sílica e sílica aluminizada.



De acordo com a Figura 20, foi possível identificar grupos funcionais presentes no suporte de sílica e de sílica aluminizada. A intensidade da banda em  $980\text{ cm}^{-1}$ , referente à vibração dos grupos silanóis livres da superfície da sílica, diminui na sílica aluminizada quando comparado ao espectro da sílica pura, devido à presença das nanopartículas de alumina ligadas à sílica por meio desses grupos silanóis. Nota-se ainda a presença das bandas em  $810\text{ cm}^{-1}$  e  $470\text{ cm}^{-1}$ , características da sílica, que correspondem aos estiramentos Si-O-Si simétrico e assimétrico, respectivamente, além da deformação angular Si-O-Si (KAMITSOS; PATSIS; KORDAS, 1993). Em  $3575\text{ cm}^{-1}$  verifica-se uma banda larga de estiramento da ligação O-H referente à presença de grupos hidroxila da sílica e de moléculas de água adsorvida, a qual pode ser confirmada pela presença de banda característica de deformação da molécula de água em  $1650\text{ cm}^{-1}$ .

Para avaliar a presença do PEO na estrutura química material após o processo de imobilização térmica foi realizada a análise da amostra por espectroscopia de absorção no infravermelho, cujo espectro é apresentado na Figura 21.

Figura 21. Espectro de absorção na região do infravermelho da fase SiAl(PEO) imobilizada termicamente.



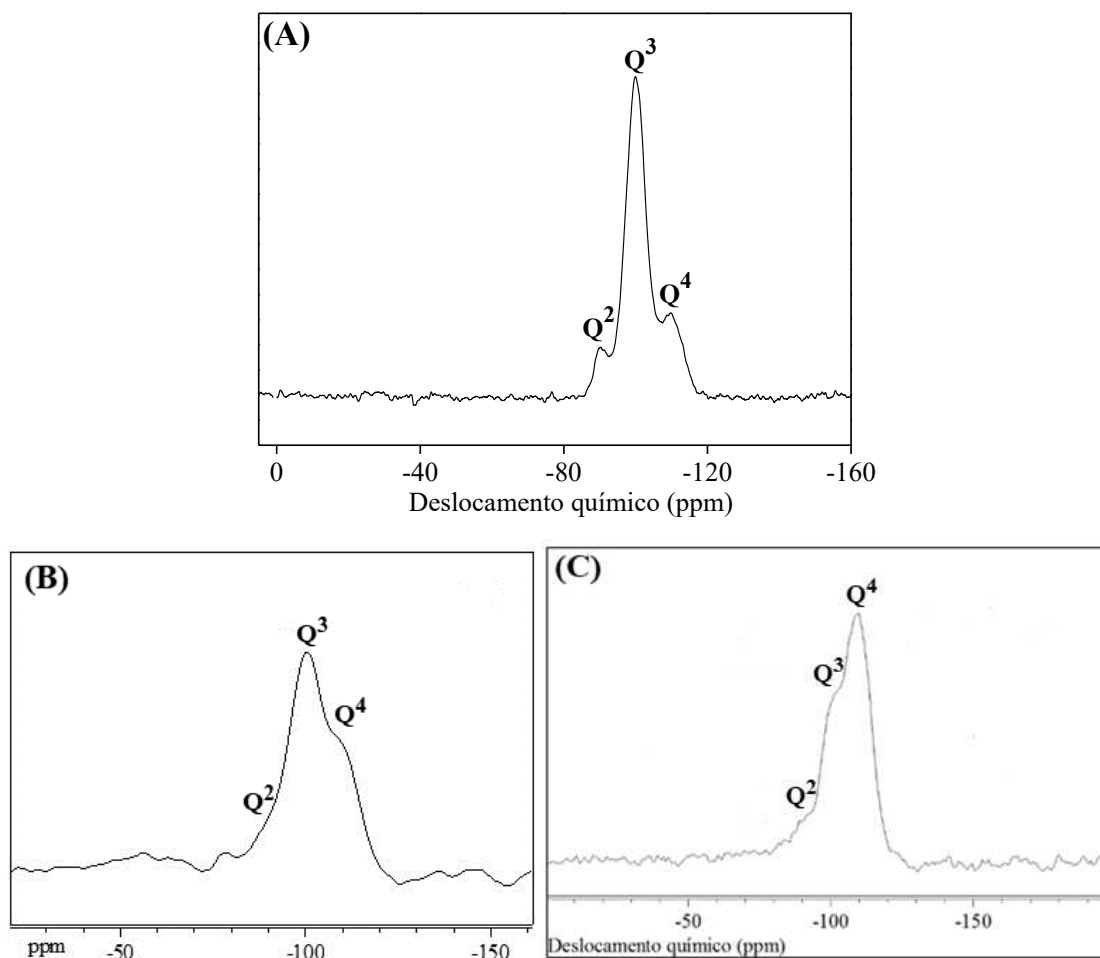
Através do espectro apresentado na Figura 21, foi possível identificar a presença de alguns grupos funcionais do copolímero PEO e do suporte de sílica aluminizada, confirmando a imobilização térmica. Na fase SiAl(PEO), o estiramento referente a ligação C-O ( $1265\text{ cm}^{-1}$ ) está sobreposto ao pico intenso e alargado na região de  $1100\text{ cm}^{-1}$  atribuído aos estiramentos de ligações Si-O-Si e Si-O-Al, como mostrado na Figura 20. Além disso, os sinais em  $2850$  e  $2960\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos ao estiramento C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente, estão presentes na fase SiAl(PEO), sendo que o material orgânico tem proveniência apenas do polímero, confirmando assim sua imobilização no suporte cromatográfico. O PEO mantém uma camada de água adsorvida, como mostrado nas bandas em  $3475$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que permanecem na fase estacionária após a imobilização sobre o suporte de sílica aluminizada. Este resultado indica que o PEO é capaz de manter moléculas de água adsorvidas na superfície da fase estacionária, mostrando seu caráter polar, que pode ser uma característica interessante para a interação diferencial com analitos polares.

#### 4.2.5 Ressonância magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$ das fases SiAl(PEO)

As espécies de silício presentes no suporte de sílica, sílica aluminizada e na fase SiAl(PEO) foram determinadas por RMN de  $^{29}\text{Si}$  empregando rotação em ângulo mágico

com polarização cruzada (CP-MAS, *cross polarization-magic angle spinning*) com o objetivo de determinar a presença da alumina incorporada na superfície da sílica, inferir sobre a possível ligação do óxido de alumínio à sílica e determinar o tipo de interação entre o suporte de sílica aluminizada com o PEO. Os espectros estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  (A) do suporte de sílica pura, (B) suporte de sílica aluminizada e (C) da fase estacionária de SiAl(PEO).



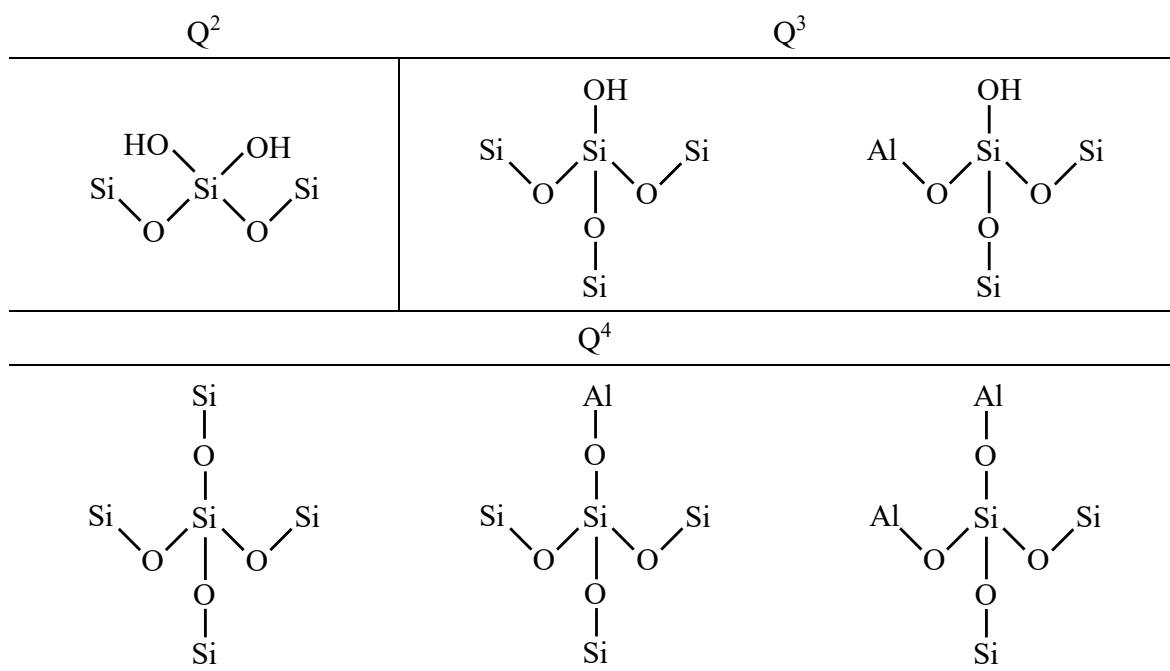
De acordo com o espectro apresentado na Figura 22, os sinais Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> e Q<sup>4</sup> referem-se às espécies de silício características da superfície da sílica (Figura 23), como grupos silanóis geminais, Si-(OH)<sub>2</sub> – Q<sup>2</sup>; grupos silanóis livres, Si-OH – Q<sup>3</sup>, e; ligações siloxano (Si-O-Si) – Q<sup>4</sup>. Estes são os únicos sinais observados no espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  do suporte de sílica. No suporte de sílica aluminizada, apresentado na Figura 22B é possível observar um alargamento e sobreposição destes sinais, bem como um deslocamento do sinal para cerca de -110 ppm, a sobreposição é referente a contribuição das espécies Q<sup>4</sup> [Si-O-Si] ( $\delta = -111$  ppm); Q<sup>3</sup> [Si-O-Si-OH] ( $\delta = -101$  ppm); Q<sup>4</sup> [Si-O-Al-O-Si] ( $\delta = -101$  ppm); Q<sup>3</sup> [Si-O-

Al-O-Si-OH] ( $\delta = -92$  ppm); Q<sup>2</sup> [Si-O-Si-OH] ( $\delta = -92$  ppm) e Q<sup>4</sup> [Si-O-Al] ( $\delta = -92$  ppm) (MAN; PELITRE; BARTHAMEUF, 1990). Esses fenômenos são atribuídos à presença da alumina ligada quimicamente ao átomo de silício do suporte de sílica, formando espécies Si-O-Al na superfície do material (SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014).

No espectro da Figura 22C era esperado um sinal entre -20 a -70 ppm, o que indicaria a presença do PEO ligado quimicamente com o suporte de sílica aluminizada. O sinal nesta região seria referente à ligação Si-C entre o polímero e a superfície da sílica (BACHMANN *et al.*, 2001). A ausência desse sinal mostra que o polímero está apenas adsorvido à superfície do suporte, ou seja, o processo de imobilização do PEO no suporte de sílica aluminizada resultou na adsorção física do polímero, sem promover ligações químicas.

Também é possível observar que a razão entre o sinal de Q<sup>3</sup>/Q<sup>4</sup> vem diminuindo de acordo com a modificações realizadas na sílica. Com adição da alumina (Figura 22B) à sílica, a razão diminui de 4 para 1,8, e pode ser atribuído a ligação Si-O-Al, que reduz a quantidade de grupos silanóis livres na superfície do suporte pela ligação do alumínio ao suporte através dos grupos Si-OH da sílica. Com adição do PEO (Figura 22C), a razão Q<sup>3</sup>/Q<sup>4</sup> tem uma diminuição mais acentuada, assumindo um valor de 0,8, sendo atribuída ao recobrimento do suporte de sílica aluminizada com a camada polimérica, consequentemente diminuindo mais a atividade dos silanóis livres.

Figura 23. Espécies de silício presentes no suporte de sílica aluminizada.



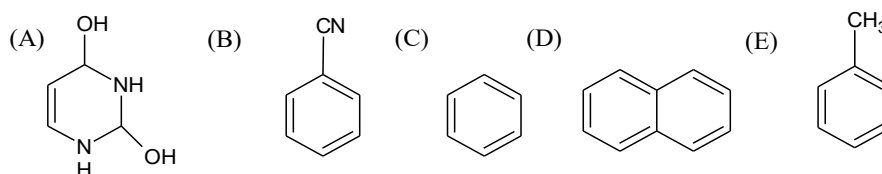
### 4.3 Caracterização cromatográfica da fase SiAl(PEO)

As fases SiAl(PEO) preparadas sob diferentes condições de carga polimérica e temperatura de imobilização, conforme a Tabela 1 (pág. 34), foram caracterizadas cromatograficamente através da análise de uma mistura teste e pelo protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989), o qual já é bem estabelecido na caracterização de fases estacionárias reversas para CLAE, possibilitando avaliar a seletividade e propriedades de retenção das fases SiAl(PEO).

#### 4.3.1 Análises cromatográficas da mistura-teste hidrofóbica

Inicialmente, as fases preparadas foram aplicadas na separação de uma mistura teste a fim de avaliar o mecanismo de separação envolvido na fase SiAl(PEO). Esta mistura é constituída de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno (Figura 24), compostos hidrofóbicos normalmente empregados para a caracterização de fases reversas.

Figura 24. Estrutura dos componentes da mistura teste (A) uracila, (B) benzonitrila, (C) benzeno, (D) naftaleno e (E) tolueno.

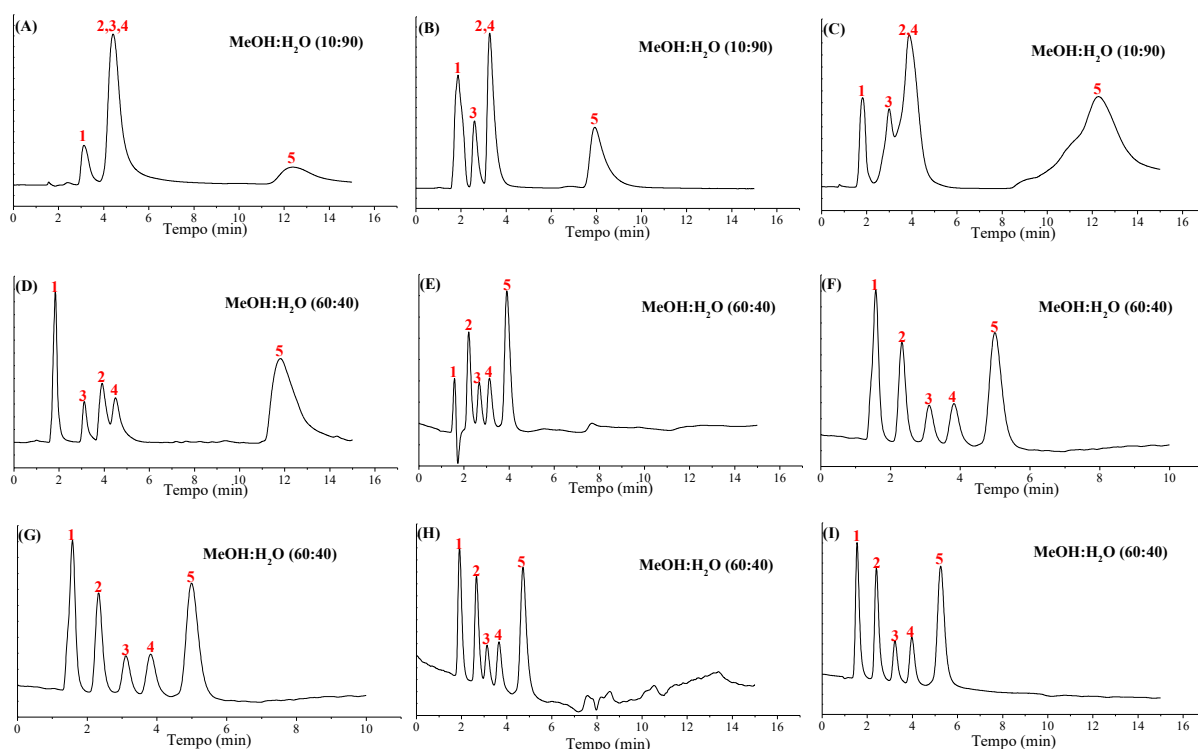


A composição ideal da fase móvel (FM) para a análise da mistura nas fases SiAl(PEO) foi determinada a partir da separação da mistura teste padrão, avaliando diferentes composições de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O, porém sempre iniciando os testes com a composição 50:50, v/v. Para tal, fases móveis contendo diferentes composições de metanol e água foram empregadas para promover a melhor separação da mistura. Os cromatogramas obtidos a partir da separação da mistura hidrofóbica nas fases SiAl(PEO), preparadas segundo o planejamento experimental 3<sup>2</sup>, que resultaram em melhores separações estão apresentados na Figura 25.

A separação da mistura padrão através das fases estacionárias SiAl(PEO) se mostrou eficiente como apresentado na maioria dos cromatogramas da Figura 25. É possível observar

que para a fase SiAl(PEO) #1 não ocorreu a separação total dos componentes (Figura 25A), observando-se apenas três picos para os cinco compostos da mistura. A uracila (1), empregada na mistura padrão e nas demais misturas avaliadas nesse trabalho, é utilizada como marcador do tempo da fase móvel, ou seja, do tempo que a fase móvel leva para percorrer o sistema cromatográfico desde o momento da injeção até a detecção. Para as fases SiAl(PEO) #2 e #3 ocorreu uma pequena melhora na separação, porém não resolveu totalmente os compostos da mistura, ocorrendo a co-eluição da benzonitrila (2) e benzeno (3). Essas três primeiras fases ainda necessitaram de um teor de água elevado na fase móvel (90 %). A falta de seletividade pode estar relacionada com a baixa temperatura de imobilização (100 °C) que, mesmo com o aumento da carga polimérica, não garantiu um aumento significativo da porcentagem de carbono imobilizado.

Figura 25. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica composta de (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtida pelas fases SiAl(PEO). Condições de análise: MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90, v/v): (A) Fase #1; (B) Fase #2; (C) Fase #3; (D) Fase #4; fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v): (E) Fase #5; (F) Fase #6; (G) Fase #7; (H) Fase #8; (I) Fase #9. Vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm.



Para as fases preparadas com temperatura de imobilização a partir de 125 °C (fases SiAl(PEO) #4 a #9), houve um melhor desempenho cromatográfico, registrando picos individuais para os cinco compostos da mistura teste padrão. A partir da fase SiAl(PEO) #5 a eluição dos compostos apresentou separação típica no modo de fase reversa, com alta eficiência de separação.

Uma das principais características observadas com as fases SiAl(PEO) é a sua capacidade de separar uma mistura teste tipicamente hidrofóbica com alto teor de água na composição da fase móvel. Característica esta que pode ser atribuída ao caráter mais polar da fase estacionária com a presença da unidade monomérica do óxido de etileno.

A partir dos cromatogramas (Figura 25) obtidos para as fases preparadas segundo o planejamento experimental  $3^2$ , foi calculado o número de pratos referente ao pico do naftaleno (5), o qual está apresentado na Tabela 6.

*Tabela 6. Porcentagem de carbono (%C) e número de pratos (N) para as fases SiAl(PEO) preparadas de acordo com um planejamento fatorial fracionário  $3^2$ , em que  $x_1$  e  $x_2$  representam os valores codificados pelas equações  $x_1 = \frac{\%Carga-35}{15}$  e  $x_2 = \frac{T-125}{25}$ .*

<b>Fase SiAl(PEO)</b>	<b>Carga (% m/m)</b>	<b>T (°C)</b>	<b><math>x_1</math></b>	<b><math>x_2</math></b>	<b>%C</b>	<b>N</b>
#1	20	100	-1	-1	4,79	320
#2	35	100	0	-1	4,88	790
#3	50	100	+1	-1	5,43	250
#4	20	125	-1	0	5,19	620
#5	35	125	0	0	7,94	970
#6	50	125	+1	0	8,87	1010
#7	20	150	-1	+1	5,14	320
#8	35	150	0	+1	7,11	1330
#9	50	150	+1	+1	8,49	1280

Através dos dados apresentados pela Tabela 6 é possível observar que maiores porcentagens de carbono resultam em um maior número de pratos, ou seja, as fases SiAl(PEO) com maior quantidade de PEO imobilizada na superfície do suporte tem melhor desempenho na separação de solutos. As fases #5, 6, 8 e 9 apresentam os maiores valores para porcentagens de carbono e número de pratos, demonstrando que a presença do PEO não

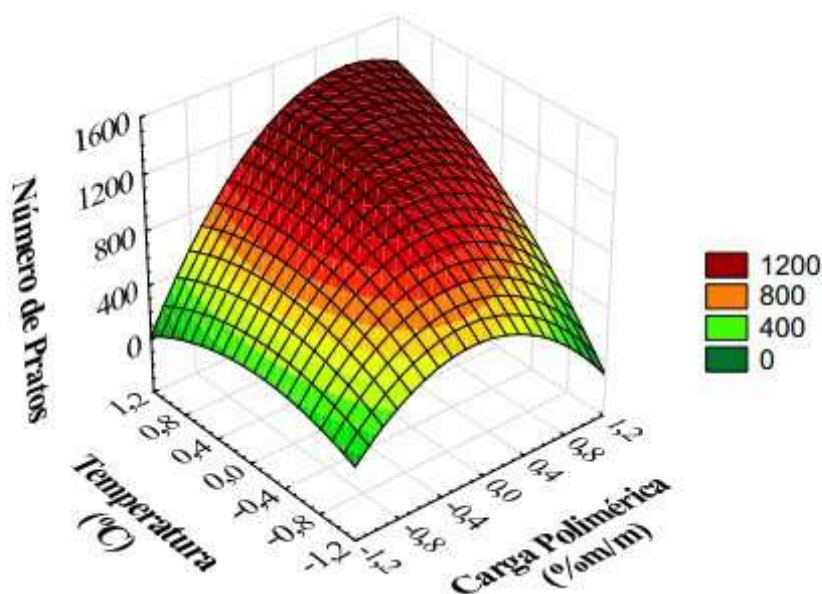


afeta de forma significativa a taxa de transporte de massa, pelo contrário, aumenta a eficiência de separação da mistura padrão em um curto tempo de análise.

Para determinar as melhores condições de preparo das fases SiAl(PEO), também em função de eficiência de separação dos compostos (número de pratos), foi construída uma superfície de resposta, que se encontra na Figura 26.

Pela superfície de resposta da Figura 26 é possível observar que a partir do nível intermediário, 35 % e 125 °C, valores codificados de 0 e 0, da carga polimérica e da temperatura, respectivamente, obtiveram-se os mais elevados números de pratos e, conseqüentemente, uma alta eficiência de separação.

Figura 26. Superfície de resposta em Número de pratos para as fases SiAl(PEO) preparadas de acordo com um planejamento fatorial fracionário  $3^2$ .

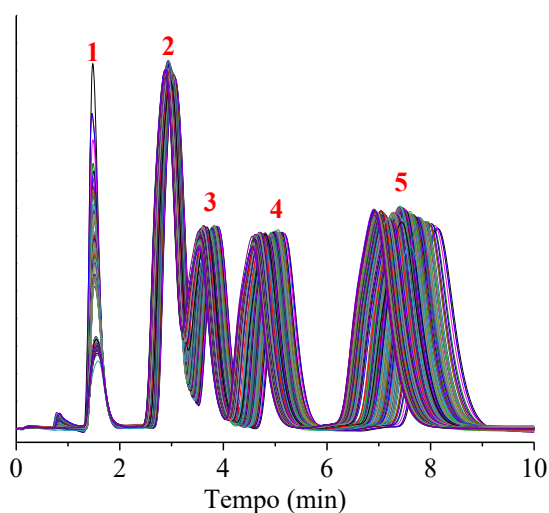


Uma vez otimizadas as condições de preparo, avaliou-se a estabilidade dos parâmetros de retenção das fases SiAl(PEO), submetendo-as a análises sequenciais sob as mesmas condições de fase móvel, MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50,v/v). Realizaram-se 192 análises da mistura teste com vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 254 nm. Os cromatogramas obtidos para avaliação da estabilidade dos parâmetros de retenção estão apresentados na Figura 27.

Pelos cromatogramas obtidos da separação da mistura teste hidrofóbica a partir de sucessivas análises na fase SiAl(PEO), observa-se que os tempos de retenção e área dos compostos não apresentaram variação significativa, exibindo um desvio padrão relativo de 4,43 % e 1,28 %, respectivamente. Todos os valores foram calculados a partir do pico

referente ao naftaleno (5), que é o composto de maior interação com a FE. Isso indica a efetividade da imobilização do PEO sobre a sílica aluminizada, ou seja, não há lixiviação significativa do PEO com a passagem contínua de fase móvel.

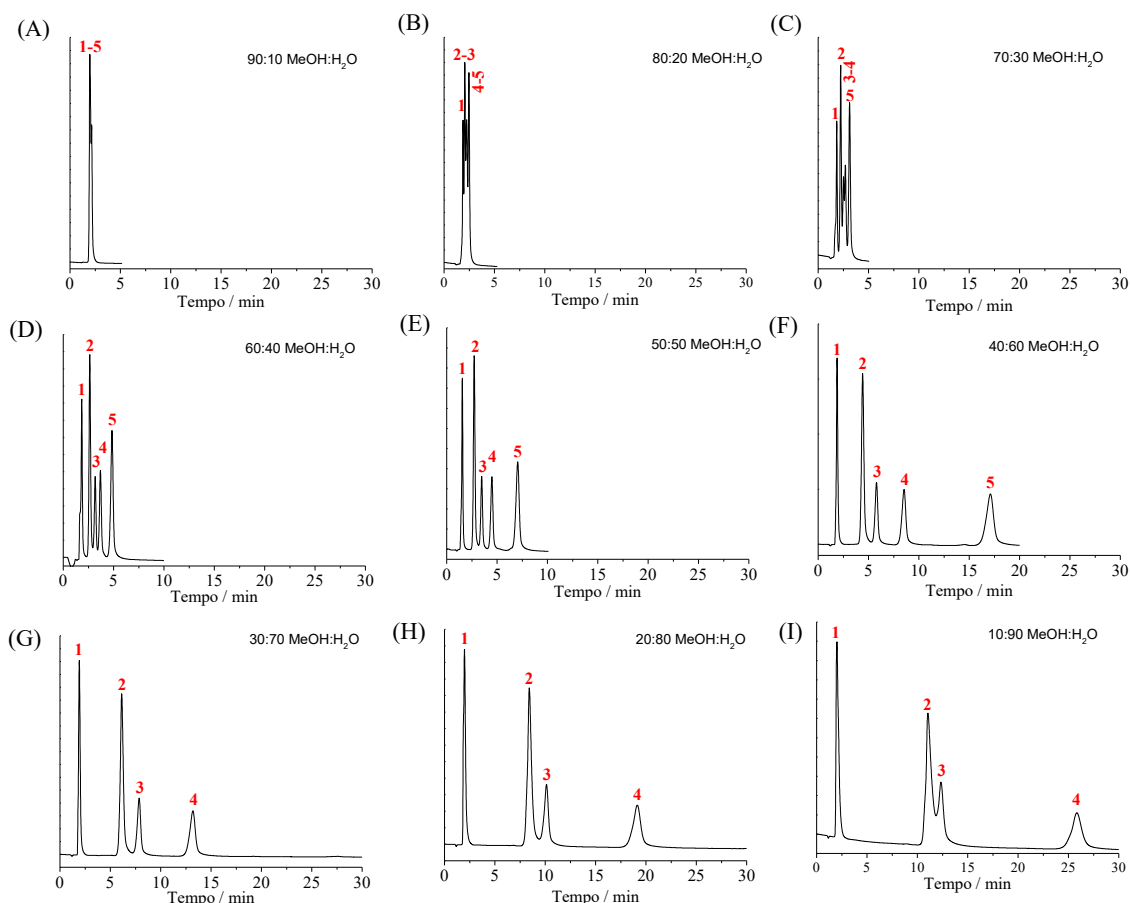
Figura 27. Cromatogramas sobrepostos da separação sequencial da mistura teste padrão pela fase SiAl(PEO) com carga polimérica de 50 % e imobilizada a 135 °C . Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50, v/v. Vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm. Compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno. 192 análises sucessivas.



A cromatografia líquida de alta eficiência é conhecida como uma técnica de geração de grandes volumes de resíduos orgânicos, devido ao alto consumo de solvente orgânico na fase móvel. No entanto, as fases SiAl(PEO) produzidas neste trabalho, conseguiram separar as substâncias de misturas apolares com baixo teor de solvente orgânico, minimizando o seu consumo e a subsequente geração de resíduos.

A fase SiAl(PEO) #9 foi utilizada para avaliar o quanto o componente aquoso da fase móvel pode afetar a separação de compostos da mistura teste hidrofóbica. Para isso, a mistura teste padrão foi submetida a separação pela fase SiAl(PEO) sob diferentes porcentagens de água na fase móvel, variando de 10 a 90 %. Na Figura 28 estão apresentados os cromatogramas obtidos para estas análises.

Figura 28. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica composta de (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtida pelas fases SiAl(PEO) sob diferentes condições de fase móvel análise (A) MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10, v/v); (B) MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v); (C) MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v); (D) MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v); (E) MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v); (F) MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v); (G) MeOH:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v); (H) MeOH:H<sub>2</sub>O (20:80, v/v); (I) MeOH:H<sub>2</sub>O (10:90, v/v). Vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm.



Através da Figura 28 é possível observar que, aumentando a porcentagem de água na fase móvel, a uma melhor separação dos componentes da mistura teste. Nas Figura 28A, 28B e 28C não é possível se obter uma separação de todos os componentes da mistura, os compostos são eluídos rapidamente da coluna cromatográfica fazendo com que não haja uma separação satisfatória. A partir da Figura 28D é possível obter uma separação completa dos componentes da mistura, com porcentagem de água igual a 40%. Nas Figura 28E e 28F também é possível observar a separação completa dos componentes da mistura em análises em um tempo relativamente curto. Os cromatogramas obtidos para porcentagens de água acima de 70 % indicam uma análise demorada, em que mesmo decorridos 30 min de análise

não há o registro do pico do naftaleno. Essas condições com baixo teor de solvente orgânico, indicam uma menor força cromatográfica, fazendo com que os compostos demorem a ser eluídos da coluna e, conseqüentemente, gerando picos alargados e de baixa eficiência. Para avaliar o desempenho da coluna cromatográfica recheada com a fase desenvolvida nesse trabalho, os parâmetros cromatográficos foram retirados para condição de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), os valores estão apresentados pela Tabela 7.

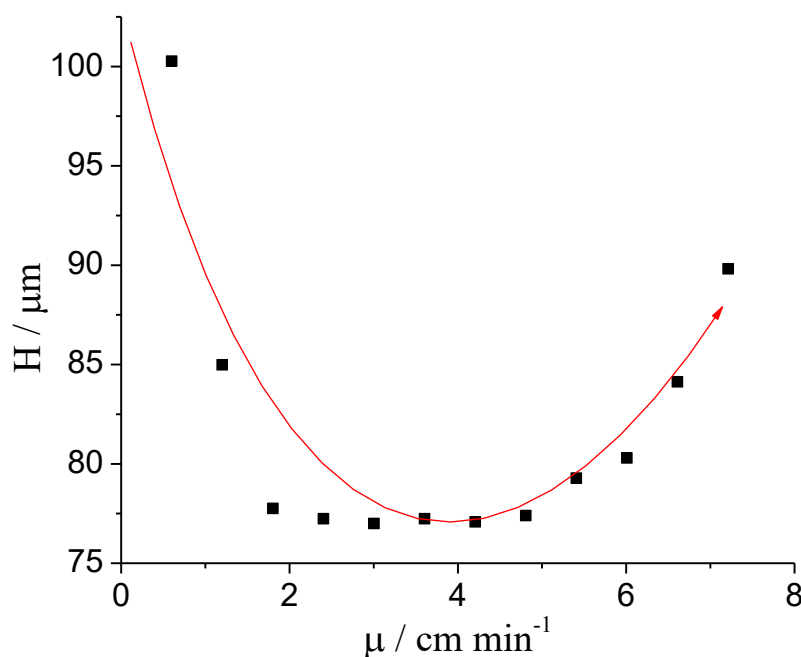
*Tabela 7. Parâmetros cromatográficos para a coluna SiAl(PEO) #9, empregando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v).*

<i>Compostos</i>	<i>t<sub>R</sub></i>	<i>k</i>	<i>R<sub>s</sub></i>	<i>A<sub>S10%</sub></i>	<i>N/m</i>
<i>Benzonitrila</i>	2,42	0,52	3,43	1,19	9560
<i>Benzeno</i>	2,72	0,91	2,13	0,99	11134
<i>Tolueno</i>	4,09	1,29	1,74	0,94	11720
<i>Naftaleno</i>	5,54	2,10	3,07	0,90	13120

A Tabela 7 apresenta valores para 4 dos componentes da mistura teste, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Os parâmetros referentes ao pico da uracila não compõem a Tabela já que é utilizada como marcador do tempo da fase móvel. Os valores de k para a benzonitrila e benzeno indicam que os compostos possuem pouca interação com a fase estacionária, possuindo valores abaixo de 1,00. O tolueno e o naftaleno indicam boa interação soluto-fase estacionária. A separação da mistura teste possui resolução para fins quantitativos, valores acima de 1,50, indicando separação em linha de base. Os valores de A<sub>S10%</sub> indicam valores aceitáveis entre 0,9 e 1,2, mesmo o naftaleno que é o composto mais retido na coluna cromatográfica, indicando um recobrimento adequado do suporte com a camada polimérica, uma vez que não há interação do suporte cromatográfico com o analito.

A vazão ótima para análise com a fase SiAl(PEO) foi determinada através da curva de Van Deemter, que relaciona à altura de pratos (H) com a velocidade linear ( $\mu$ ). O ponto mínimo da curva indica a velocidade linear da fase móvel que proporciona a máxima eficiência. Os valores de H foram obtidos a partir do pico do naftaleno presente na mistura teste e os valores de  $\mu$  estão relacionados com a vazão da fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v). **A Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta a curva de Van Deemter para fase SiAl(PEO) #9 utilizada como recheio de uma com 150 mm × 4 mm de d.i, o intervalo de vazão utilizado no estudo foi de 0,1 a 1,2 mLmin<sup>-1</sup>.

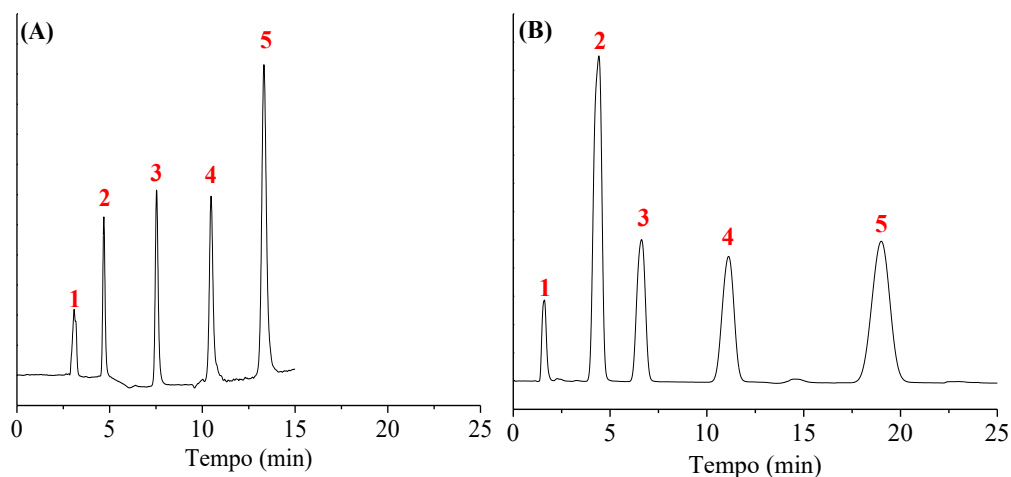
Figura 29. Curva de Van Deemter para fase SiAl(PEO) #9 .



A curva apresentada pela Figura 29 indica o comportamento da fase em relação a vazão da fase móvel. O ponto mínimo da curva indica que qualquer vazão entre 0,6 e 0,8 mL min<sup>-1</sup> (velocidade linear de 3,5 a 4,5 cm min<sup>-1</sup>) indica máxima eficiência, e conseqüentemente menor valor de H para fase SiAl(PEO). Os valores de H referem-se ao composto mais retido da mistura, o naftaleno, que possui maior interação com a fase estacionária. A mesma mistura teste quando analisada por uma coluna recheada com uma fase C<sub>18</sub> comercial típica necessitou de 80 % de solvente orgânico na composição da fase móvel para alcançar um grau de separação similar a fase SiAl(PEO) (Figura 30. A), porém com um tempo total de análise cerca de 2,5 vezes menor. Este tempo de análise aumenta, quando a separação dos compostos na fase C<sub>18</sub> ocorre nas mesmas condições de separação das melhores fases SiAl(PEO), MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v) (Figura 30. B), na qual se obteve um tempo total de análise cerca de 4 vezes maior.

Através dos cromatogramas apresentados pela Figura 30. é possível inferir que, na coluna contendo fase C<sub>18</sub> comercial é necessário o consumo de um alto volume de solvente orgânico (80 %) para que se tenha uma separação em um menor tempo de análise sem que haja co-eluição dos picos. Quando se reduz a porcentagem de solvente orgânico há separação dos picos, mas há um aumento significativo no tempo de análise quando comparado às fases SiAl(PEO).

Figura 30. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura teste pela fase  $C_{18}$  comercial. (A) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) e (B) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno.



#### 4.3.2 Análises cromatográficas do protocolo 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 a qualidade e as propriedades de suas fases estacionárias, principalmente na modalidade de fase reversa, a qual é a mais utilizada dentre as aplicações da CLAE. O protocolo de Tanaka é composto de quatro misturas testes que devem ser separadas pelas fases estacionárias em estudo, empregando para cada mistura uma condição pré-definida de análise (Tabela 3, pág. 40).

As medidas dos tempos de retenção dos picos, obtidos após a separação, são utilizadas para caracterizar as propriedades de retenção da fase estacionária e sua capacidade de separar substâncias que se diferem por pequenos grupos funcionais. As propriedades das fases SiAl(PEO), medidas pelo protocolo de Tanaka, foram:

- **Hidrofobicidade ( $k_{PB}$ )** – Medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno na mistura I. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento da superfície do suporte cromatográfico;
- **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

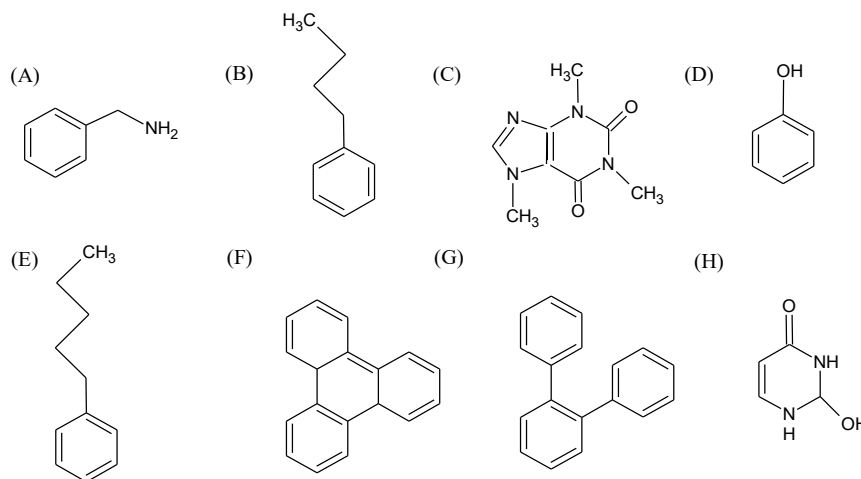
da fase em diferenciar compostos orgânicos durante a separação, pois a seletividade hidrofóbica mede o grau de separação de alquilbenzenos distintos por um grupo  $\text{CH}_2$ ;

- **Seletividade estérica ( $\alpha_{T/O}$ )** – Medida pela razão dos fatores de retenção do trifenileno e do *o*-terfenilo,  $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$ . O  $\alpha_{T/O}$  mede a capacidade da fase estacionária em separar duas substâncias com polaridades 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 dos 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 ( $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$ )** – Propriedade medida pela razão dos fatores de retenção da benzilamina e do fenol,  $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60} = k_B/k_P$ , 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 dos 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.

As estruturas dos compostos das misturas testes de Tanaka estão apresentadas na

Figura 31.

Figura 31. Estrutura dos componentes das misturas de Tanaka e colaboradores (A) benzilamina, (B) butilbenzeno, (C) cafeína, (D) fenol, (E) pentilbenzeno, (F) trifenileno, (G) *o*-terfenilo e (H) uracila.



As propriedades de retenção da fase SiAl(PEO) obtidas a partir da separação da mistura teste de Tanaka são apresentadas na Tabela 8, para as fases estacionárias SiAl(PEO) #3 em diante, uma vez que as fases #1 e #2 não foram capazes de promover a separação das misturas propostas.

*Tabela 8. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases SiAl(PEO).*

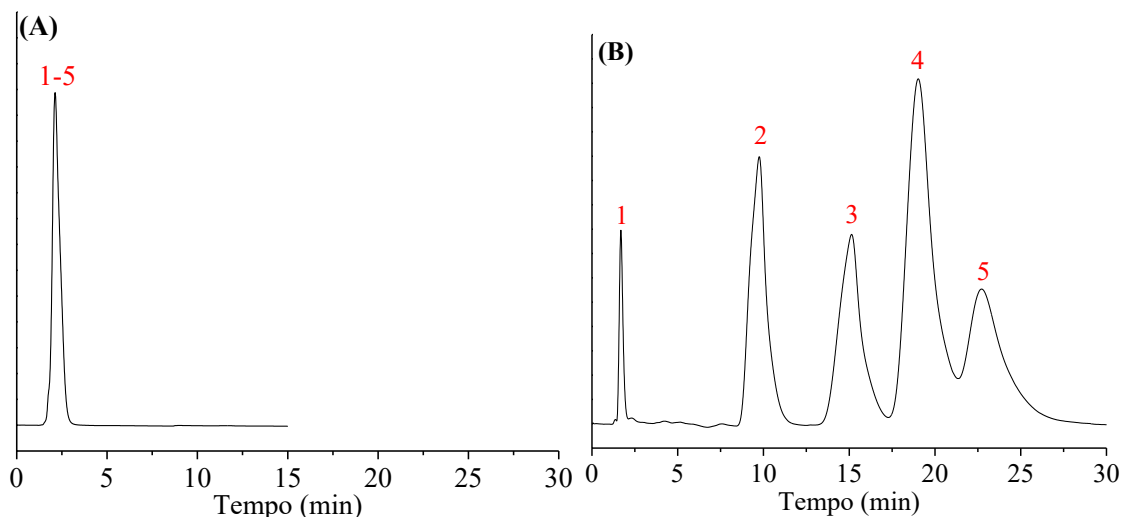
Parâmetros	Fases SiAl(PEO)						
	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
$k_{PB}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{CH_2}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{T/O}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{C/P}$	1,00	1,00	0,31	0,24	0,50	0,27	0,21
$\alpha_{B/P\ pH\ 7,6}$	2,12	2,18	3,55	1,13	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{B/P\ pH\ 2,7}$	2,23	2,10	1,86	1,73	1,00	1,00	1,70

$k_{PB}$ : hidrofobicidade,  $\alpha_{CH_2}$ : seletividade hidrofóbica,  $\alpha_{T/O}$ : seletividade estérica,  $\alpha_{C/P}$ : capacidade de ligação de hidrogênio,  $\alpha_{B/P\ pH\ 7,6}$ : capacidade de troca iônica total e  $\alpha_{B/P\ pH\ 2,7}$ : capacidade de troca iônica em meio ácido

A partir dos dados apresentados na Tabela 8 é possível perceber que a hidrofobicidade ( $k_{PB}$ ), a seletividade hidrofóbica ( $\alpha_{CH_2}$ ) e a seletividade estérica ( $\alpha_{T/O}$ ), que são parâmetros que dependem da separação da Mistura de Tanaka I, apresentaram valores iguais a 1, como resultado da não separação dos compostos desta mistura (Figura 32A). Este fato se deu em virtude das fases SiAl(PEO), como mostrado anteriormente e, apesar de separar na modalidade de fase reversa, possuir uma característica mais polar, requerendo uma fase móvel de menor força cromatográfica. Sob condições preconizadas pelo protocolo teste de Tanaka, 80 % de metanol, a força cromatográfica da fase móvel se torna elevada, arrastando fortemente todos os compostos da fase estacionária, impedindo a separação dos mesmos. No entanto, a capacidade de separação de substâncias hidrofóbicas com alta porcentagem de água na modalidade de fase reversa já foi demonstrada na separação da mistura teste padrão. Portanto, aumentando a porcentagem de água na FM, de 20 % para 50 %, é possível obter a separação dos compostos da Mistura de Tanaka I (Figura 32B).



Figura 32. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura de Tanaka I pela fase SiAl(PEO). (A) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) e (B) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- butilbenzeno, 3- pentilbenzeno, 4- o-terfenilo e 5- trifenileno.



A capacidade de ligação de hidrogênio, obtida a partir da separação dos compostos da Mistura de Tanaka II, teve a ordem de eluição invertida quando comparada à obtida em uma coluna C<sub>18</sub> convencional (CRUZ *et al.*, 1997). Nesta mistura, o valor de  $\alpha_{C/P}$  foi menor que aqueles obtidos por fases reversas convencionais ( $> 0,6$ ), indicando baixa capacidade da fase SiAl(PEO) em realizar ligações de hidrogênio com a mistura. Este fato pode levar a duas implicações, a primeira é que a fase SiAl(PEO) não possui quantidade significativa de grupos silanóis descobertos, capazes de realizar ligações de hidrogênio com os compostos, e a segunda, é que apesar da presença de grupos silanóis residuais, a polaridade da camada de PEO na fase compete com os grupos silanóis da fase por compostos mais polares, minimizando o efeito de formação de ligação de hidrogênio. Considerando que o recobrimento polimérico, apesar de propiciar maior proteção ao suporte, não é completo, a segunda condição é a mais provável. Este fator corrobora com o fato de que fases estacionárias imobilizadas em temperaturas mais elevadas normalmente geram melhores recobrimentos das partículas dos suportes, conforme indicado na Tabela 4.

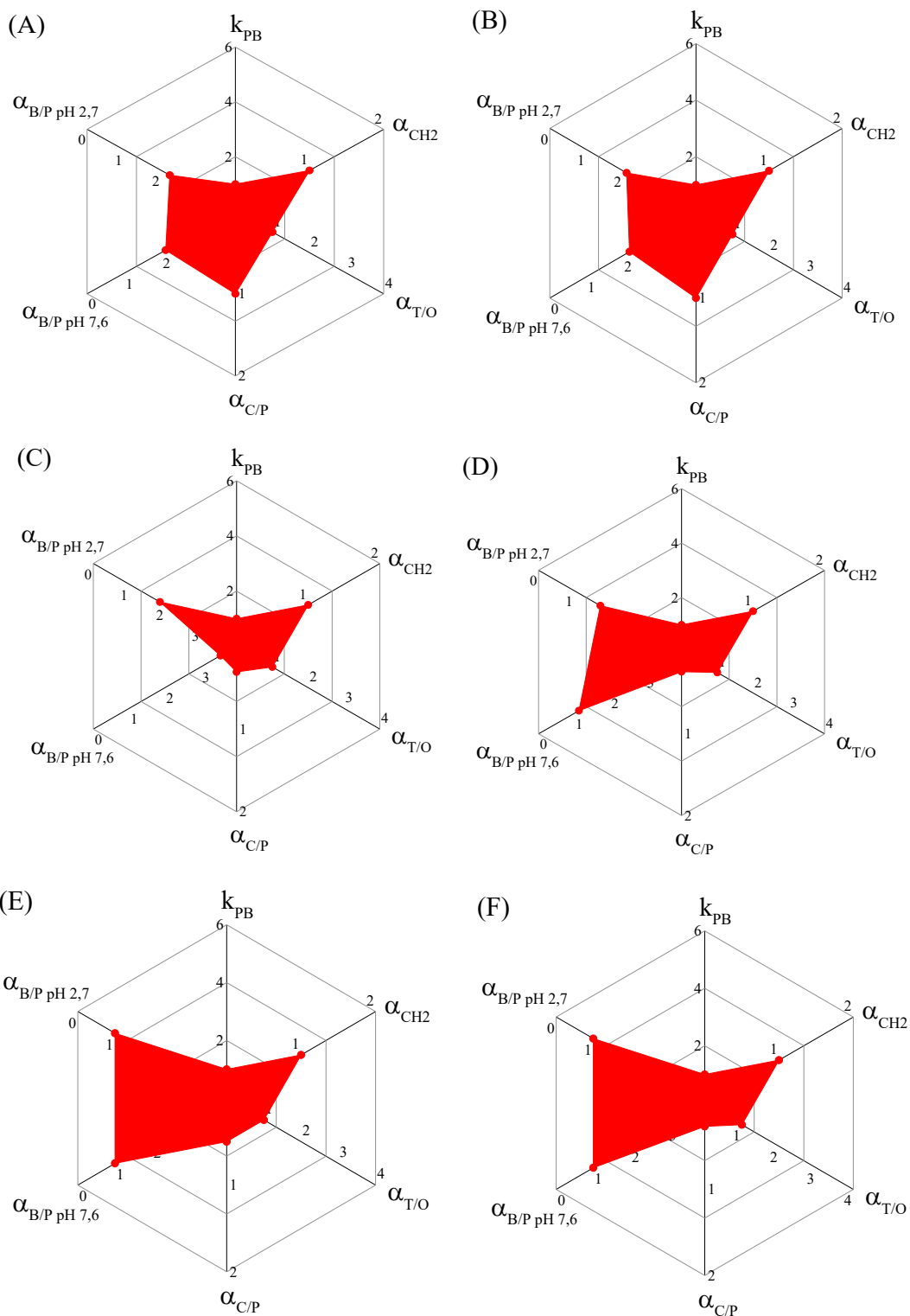
A capacidade de troca iônica das fases SiAl(PEO) foi determinada através da análise da Mistura de Tanaka III, na qual a fase móvel encontra-se em pH 7,60. Neste pH, quase a totalidade dos grupos silanóis residuais estão desprotonados ( $-\text{SiO}^-$ ), portanto, devem interagir eletrostaticamente com a benzilamina, que estará parcialmente protonada (pKa 9,30), ficando retida fortemente na coluna cromatográfica. No entanto, nas fases SiAl(PEO),

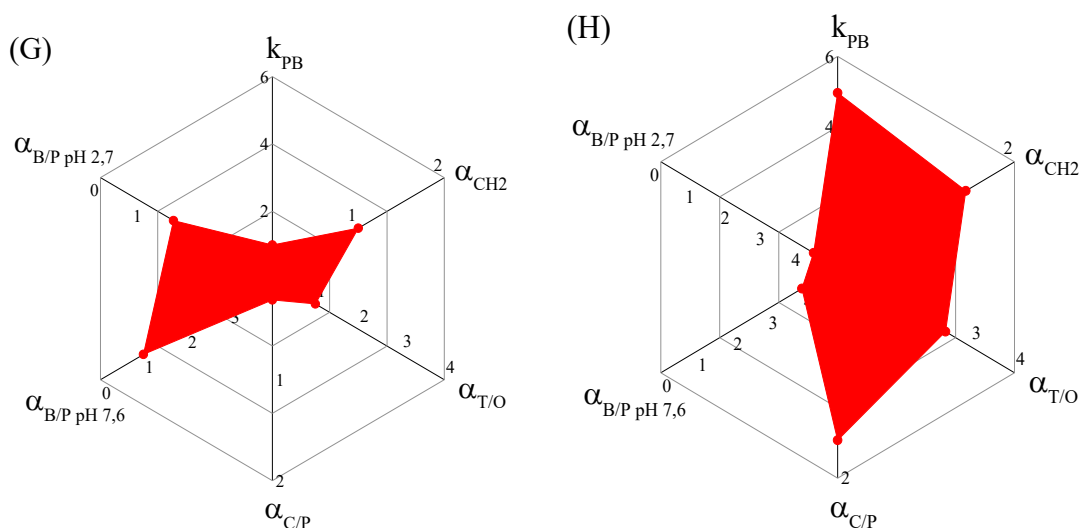
além da proteção aos grupos silanóis do polímero, há também o recobrimento com nanopartículas de alumina que, nessa condição de pH os poucos sítios Al-OH do material, estão positivamente carregados. Assim, observa-se que os valores de  $\alpha_{B/P}$  em pH 7,60 são, de uma forma geral, menores que os apresentados pelas fases reversas comerciais tradicionais (CRUZ *et al.*, 1997). É importante salientar também que, quanto maior o recobrimento polimérico nas fases SiAl(PEO) menores foram os valores do  $\alpha_{B/P}$  pH 7,60, resultando em menor retenção da benzilamina na fase SiAl(PEO).

A acidez da fase SiAl(PEO) foi medida pelo parâmetro  $\alpha_{B/P}$  pH 2,70 a partir da separação de benzilamina e fenol empregando fase móvel tamponada em pH 2,70. Nesta condição, a benzilamina e os grupos residuais do suporte (Si-OH ou Al-OH) encontrar-se-ão totalmente protonados. Logo, somente haverá interação residual entre a superfície do suporte e a benzilamina se os grupos residuais forem suficientemente ácidos para que em pH 2,70 permanecessem desprotonados. Logo, o  $\alpha_{B/P}$  pH 2,70 é um indicativo da acidez superficial da fase, quanto maior o seu valor maior é a retenção da benzilamina e mais ácida é a superfície da fase. Para as fases SiAl(PEO) immobilizadas a temperaturas superiores a 125 °C, os valores de  $\alpha_{B/P}$  pH 2,70 foram menores que para as fases SiAl(PEO) preparadas nas demais condições, indicando um melhor recobrimento da fase.

Foi observado a partir das separações das misturas testes de Tanaka pelas fases SiAl(PEO) a baixa capacidade de separação da mistura de Tanaka I, que é constituída por substâncias hidrofóbicas, e a capacidade de retenção e separação dos compostos polares, presentes nas misturas de Tanaka II, III e IV. Esta condição implica em uma fase com seletividade peculiar para substâncias polares. A Figura 33 apresenta gráficos do tipo radar que representam os parâmetros cromatográficos obtidos pela separação das misturas de Tanaka por cada fase SiAl(PEO) preparada neste trabalho.

Figura 33. Gráficos radar das propriedades de retenção das fases SiAl(PEO) obtidas pela separação das misturas de Tanaka pelas fases SiAl(PEO) (A) #3; (B) #4; (C) #5; (D) #6; (E) #7; (F) #8, (G) #9 e por uma fase (H)  $C_{18}$  comercial.





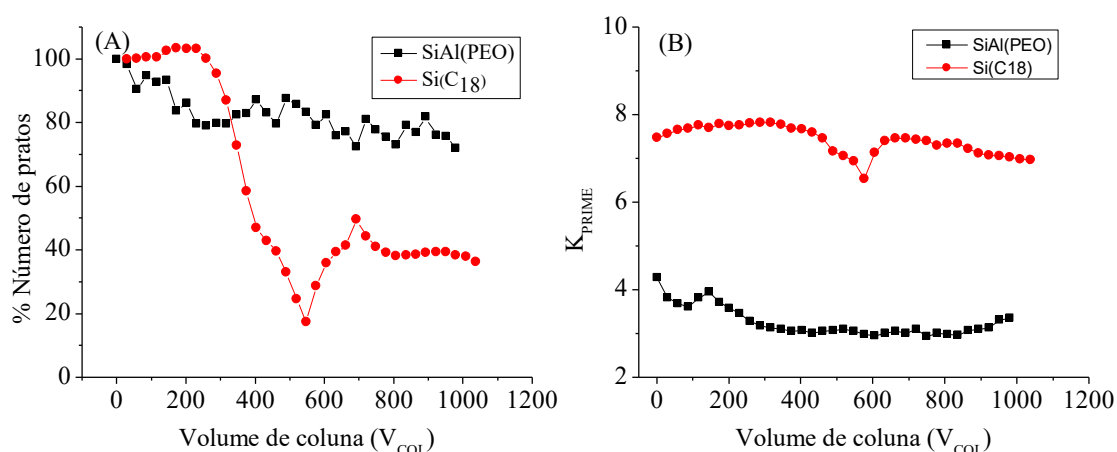
De acordo com os gráficos da Figura 33, quanto maior a área hachurada do gráfico radar, melhores são as propriedades cromatográficas de retenção das fases estacionárias preparadas sob condições distintas de imobilização do PEO. Desta forma, observa-se que para todas as fases SiAl(PEO) (Figura 33A a 33G) os valores para os três primeiros parâmetros de retenção obtidos do protocolo de Tanaka ( $k_{PB}$ ,  $\alpha_{CH2}$  e  $\alpha_{T/O}$ ) são iguais a 1,00, devido à não separação dos compostos hidrofóbicos sob condições de fase móvel com força cromatográfica elevada. No entanto, o principal diferencial das fases SiAl(PEO) preparadas está na separação de compostos polares das misturas II, III e IV de Tanaka, em que as fases SiAl(PEO) #6 e #9 apresentaram os melhores resultados de retenção cromatográfica, com o mínimo de interação residual com o suporte. Estas fases foram, também, as que apresentaram maior porcentagem de carbono, resultando em melhor recobrimento polimérico.

Os resultados obtidos para a fase SiAl(PEO) mostram que a fase possui potencial para modalidade de fase reversa, mas também pode ser utilizada para outras modalidades da cromatografia líquida de alta eficiência. A seletividade do PEO traz novas possibilidades para utilização da fase estacionária na separação de compostos polares, como por exemplo algumas classes de agrotóxicos, de fármacos, entre outras substâncias. Além disso, a maior estabilidade fornecida pela presença da alumina no suporte pode possibilitar a separação desses compostos em condições de pH da fase móvel fora da faixa de 2-8, restrita a materiais à base de sílica.

#### 4.4 Teste de Estabilidade

A estabilidade química da fase SiAl(PEO) foi avaliada utilizando-se de condições drásticas de pH e temperatura durante a análise. Esse estudo foi realizado pela passagem contínua de fase móvel pela coluna cromatográfica durante um período de tempo pré-estabelecido. Para avaliar o efeito dessas condições de análise na integridade da fase estacionária, parâmetros cromatográficos são acompanhados através de separações de uma mistura teste realizadas a cada 30 min. Para esse estudo foi utilizada a mistura teste hidrofóbica e condição de fase móvel MeOH:solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> e pH 10, 50:50 v/v, vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. A utilização de aquecimento da fase móvel potencializa o processo de degradação da fase estacionária, fazendo com que haja uma destruição mais rápida do leito cromatográfico. Para avaliar o desempenho cromatográfico da fase SiAl(PEO), dois parâmetros cromatográficos foram monitorados: o número de pratos e o fator de retenção para o naftaleno. O mesmo procedimento foi realizado com uma coluna comercial C<sub>18</sub> quimicamente ligada. A variação da porcentagem de número de pratos (% N) e fator de retenção (k) para o pico do naftaleno nas fases SiAl(PEO) e C<sub>18</sub> estão apresentados na Figura 34 em função do volume de coluna.

Figura 34. Variação da (A) eficiência de coluna e do (B) fator de retenção para as fases SiAl(PEO) e C<sub>18</sub> com a passagem contínua de fase móvel a pH 10.



Este estudo foi realizado com intuito de avaliar de forma rápida a estabilidade química da fase preparada em laboratório com uma fase estacionária comercial, empregando condições drásticas de análise. A medida da vida útil da fase estacionária é realizada a partir da queda brusca da eficiência de coluna, registrada normalmente abaixo de 50 % do número

de pratos inicial (FARIA *et al.*, 2007). É possível observar pela Figura 34A que a fase SiAl(PEO) após 1000 volumes de coluna (24h de análise) teve uma perda de aproximadamente 30% da sua eficiência, não apresentando um registro de perda brusca da eficiência, o que indica que sua capacidade de separação é mantida dentro do período estudado. Para uma coluna comercial típica, recheada com C<sub>18</sub> quimicamente ligado, a perda brusca de eficiência (morte da coluna) é registrada em torno de 400 volumes de coluna. Materiais a base de sílica possuem estabilidade química na faixa de pH 2 a 8, como o teste foi realizado em condição alcalina (pH 10) a sílica sofre a rápida dissolução do leito cromatográfico, justificando assim a perda de eficiência para a fase C<sub>18</sub>. Como na fase preparada neste trabalho uma camada de partículas de alumina foi incorporada na superfície da sílica, conferindo ao material uma estabilidade maior, proveniente do óxido de alumínio, que é estável na faixa de pH de 1 a 13. Assim, a fase SiAl(PEO) se mostrou estável a condições alcalinas de fase móvel, essa estabilidade está associada a presença de nanopartículas de alumina no suporte cromatográfico, além do recobrimento mais eficiente da camada polimérica de PEO. A utilização do polímero orgânico, juntamente com a alumina faz com que a fase estacionária tenha um ganho de vida útil sem que haja perda de seletividade do material.

A avaliação do fator de retenção durante o estudo permite avaliar a estabilidade do modificador orgânico da fase estacionária durante a eluição da fase móvel degradante. Como observado na Figura 34B, apesar de uma ligeira perda inicial de retenção a fase SiAl(PEO) manteve-se estável com relação ao fator de retenção ao longo de todo o período avaliado, indicando que a imobilização do PEO foi eficiente a ponto de proteger o material de ataque de fases móveis alcalinas. A fase comercial C<sub>18</sub>, por outro lado, se manteve estável até o momento em que ocorreu a morte da coluna, registrando uma pequena queda no fator de retenção. Logo após, os valores do fator de retenção voltaram a níveis comparáveis ao inicial, provavelmente devido a rearranjos do leito cromatográfico no interior da coluna, porém, registrando perda contínua até o fim do estudo. O menor valor do fator de retenção para a fase SiAl(PEO), comparada a fase C<sub>18</sub>, está associado à menor hidrofobicidade da camada de PEO frente ao C<sub>18</sub>, como observado nas análises cromatográficas de misturas testes hidrofóbicas.

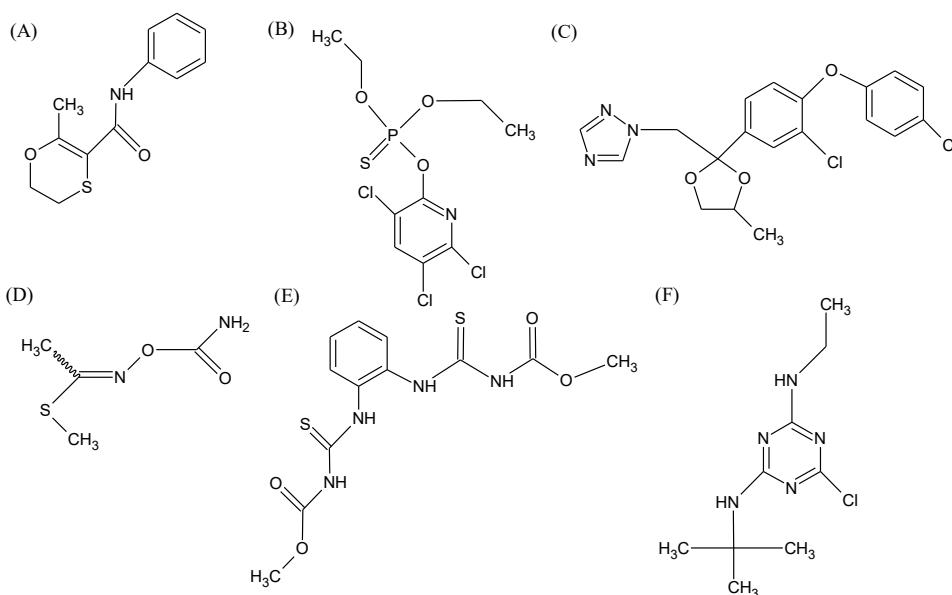
#### 4.5 Aplicabilidade da fase SiAl(PEO)

A potencialidade de uso da fase SiAl(PEO) foi avaliada pela separação de compostos que são normalmente difíceis de serem resolvidos na modalidade de fase reversa. Para tal estudo, foi utilizada uma coluna 60 x 3,9 mm de d.i, recheada com a fase estacionária com carga polimérica de 50 % e imobilizada a 150 °C, fase SiAl(PEO) #9 do planejamento experimental. Esta fase SiAl(PEO) foi aplicada na separação de duas misturas de fármacos e uma mistura de agrotóxicos, com características polares.

##### 4.4.1 Separação de agrotóxicos

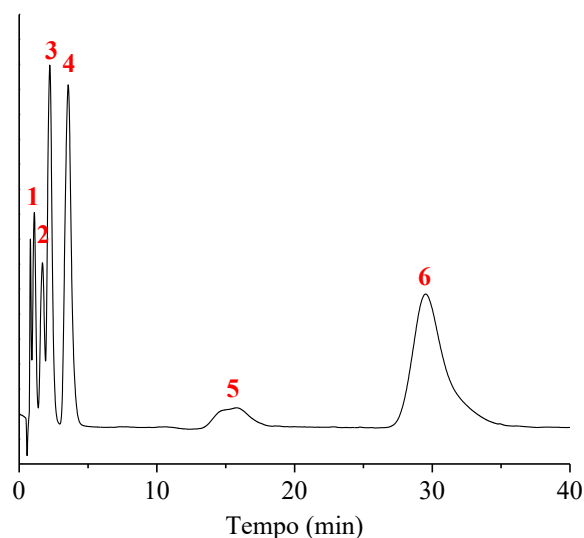
Foi realizada a separação de uma mistura composta por seis agrotóxicos, sendo estes: os inseticidas metomil e clorpirifós; os fungicidas carboxina, difenoconazol e tiofanato metílico; e o herbicida terbutilazina. Os seis agrotóxicos são utilizados principalmente nas culturas de arroz, milho e soja, com aplicações sistêmicas ou foliares. Estes compostos apresentam características polares, tornando-os assim moléculas de baixa retenção nas fases C<sub>18</sub> comercialmente disponíveis. As estruturas moleculares dos agrotóxicos em estudo estão apresentadas na Figura 35.

Figura 35. Estruturas moleculares dos compostos: (A) carboxina, (B) clorpirifós, (C) difenoconazol, (D) metomil, (E) tiofanato metílico e (F) terbutilazina.



A mistura de agrotóxicos foi analisada na coluna recheada com a fase SiAl(PEO) #9 utilizando uma fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O em proporções distintas, no modo isocrático de eluição, até a obtenção da separação de todos os compostos da mistura. Para tanto, foi determinada como melhor condição de separação dos agrotóxicos a proporção MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60 v/v). O cromatograma obtido dessa separação está apresentado na Figura 36.

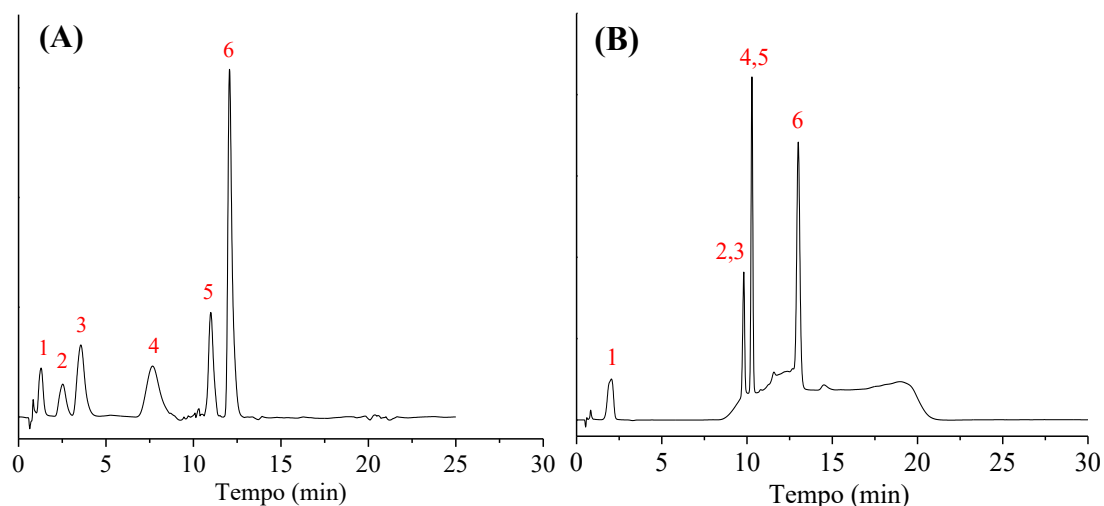
Figura 36. Cromatograma de separação da mistura de agrotóxicos pela fase SiAl(PEO). Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v), vazão 0,8 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 230 nm. Compostos: 1- metomil, 2- tiofanato metílico, 3- carboxina, 4- terbutilazina, 5- difenoconazol e 6- clorpirifós.



Conforme apresentado na Figura 36 é possível realizar a separação dos seis componentes da mistura por uma eluição isocrática, sem a utilização de aditivos na fase móvel. No entanto, o tempo de análise registrado foi longo, resultando em alargamento dos picos e consequente perda de eficiência para os compostos mais retidos. Além disso, a resolução entre os picos não ficou adequada, com picos muito próximos no início do cromatograma e muito distantes no final. Visando uma melhor separação, empregou-se um gradiente de eluição da fase móvel. Para comparação, a mistura de agrotóxicos foi analisada em uma coluna C<sub>18</sub> comercial sob as mesmas condições de análise empregadas para a fase SiAl(PEO). Os cromatogramas estão apresentados pela Figura 37.



Figura 37. Cromatogramas de separação da mistura de agrotóxicos pelas fases (A) SiAl(PEO) #9 e (B) C<sub>18</sub> comercial. Condições de análise: Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (30:70, v/v) de 0-7 min; (60:40 v/v) de 7-8 min; (60:40 v/v) de 8-18 min; (30:70 v/v) de 18-19 min, permanecendo por um minuto a 30:70 v/v; vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 230 nm. Compostos: 1- metomil, 2- tiofanato metílico, 3- carboxina, 4- terbutilazina, 5- difenoconazol e 6- clorpirifós.



Avaliando os cromatogramas apresentados pela Figura 37A é possível inferir que a eluição por gradiente melhorou significativamente a separação da mistura de agrotóxicos, reduzindo o tempo de análise e melhorando a resolução entre os picos. Este resultado indica a estabilidade da camada de PEO sobre a superfície da sílica aluminizada, uma vez que o material resiste à mudança da composição de fase móvel durante uma corrida cromatográfica. Além disso, como já foi evidenciado através da caracterização cromatográfica, a fase SiAl(PEO) tem seletividade para compostos polares e não necessita de fases móveis com alta porcentagem de solvente orgânico. Desta forma, a fase móvel, no modo gradiente, empregada para a separação dos compostos na fase SiAl(PEO) foi majoritariamente constituída de água.

A mistura de agrotóxicos também foi analisada por uma coluna C<sub>18</sub> comercial utilizando as mesmas condições para a separação na fase SiAl(PEO) (Figura 37B). O cromatograma da separação na coluna comercial mostra que não houve separação de todos os componentes da mistura. A alta porcentagem de água na fase móvel nos minutos iniciais resulta em uma baixa força cromatográfica, menor que a necessária para que os compostos sejam eluídos da coluna. Assim que é aumentada a porcentagem de metanol na fase móvel, os compostos são eluídos havendo co-eluição dos compostos tiofanato metílico e carboxina e, também, entre a terbutilazina e o difenoconazol. Esse comportamento era esperado já que

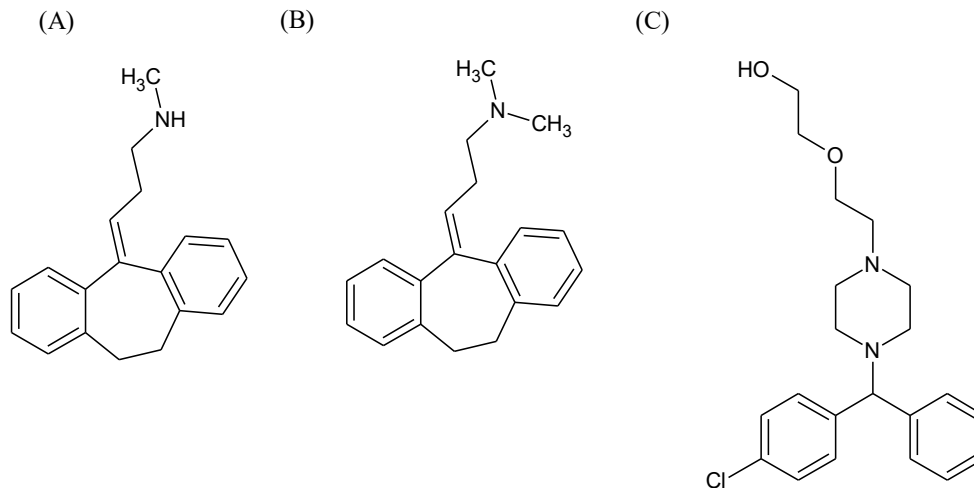
essas substâncias são normalmente difíceis de serem analisadas em fases estacionárias mais hidrofóbicas, como a fase C<sub>18</sub>.

#### 4.4.2 Separação de fármacos

Duas misturas distintas de fármacos foi utilizada para avaliar a capacidade de separação da fase SiAl(PEO) de substâncias que requerem fases móveis alcalinas, fora da faixa estável das fases quimicamente ligadas comerciais. As análises foram realizadas com fase móvel a pH 10, condição necessária para a análise dos fármacos como moléculas majoritariamente não ionizadas, pK ~ 9. Essa condição permite que o mecanismo de separação seja regido por principalmente por interações hidrofóbicas entre solutos e a fase estacionária.

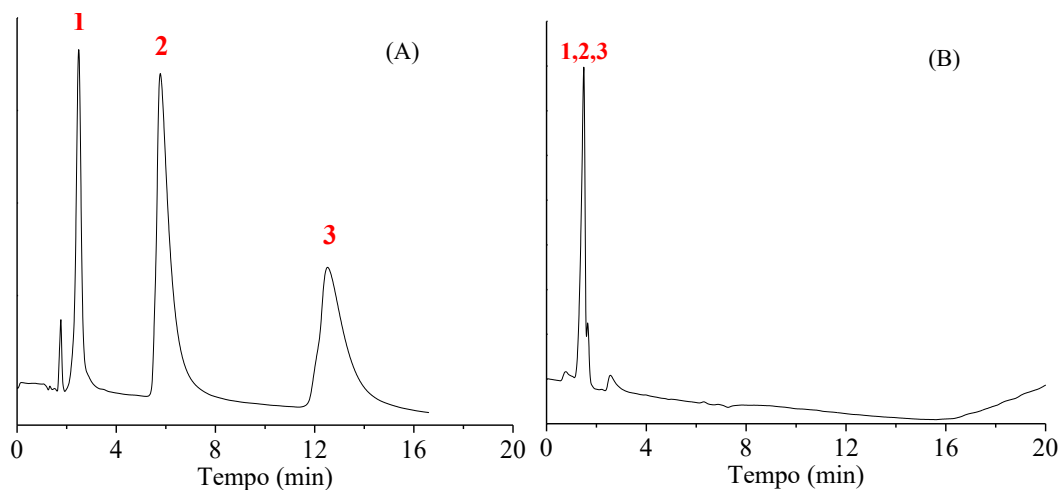
A primeira mistura de fármacos, foi composta por três antidepressivos: a nortriptilina, amitriptilina e hidroxizina, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 38.

Figura 38. Estruturas moleculares dos compostos: (A) nortriptilina, (B) amitriptilina e (C) hidroxizina.



Devido a limitações relacionadas ao suporte cromatográfico, as análises na coluna contendo a fase C<sub>18</sub> foram realizadas com fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), visando a integridade da coluna cromatográfica. A condição de fase móvel MeOH:solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> e pH 10 (70:30, v/v) foi empregada como a melhor condição de análise para mistura de antidepressivos. As mesmas condições foram aplicadas a uma coluna C<sub>18</sub> afim de comparar a separação dos compostos nos dois materiais. Os cromatogramas de separação dos antidepressivos nas colunas avaliadas estão apresentados na Figura 39.

Figura 39. Cromatogramas de separação da mistura de antidepressivos pelas fases (A) SiAl(PEO) #9 e (B) C<sub>18</sub> comercial. Condições de análise: (A) Fase móvel MeOH: Solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> e pH 10 (70:30, v/v). (B) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v). Compostos: 1- hidroxizina, 2- nortriptilina e 3- amitriptilina.

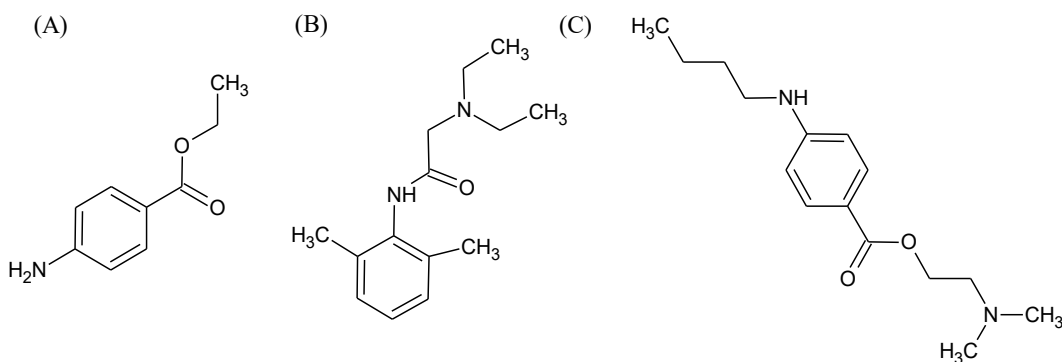


A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 39 é possível inferir que houve separação total dos componentes da mistura de antidepressivos na fase preparada em laboratório, SiAl(PEO), e não se obteve separação na fase comercial C<sub>18</sub>. A Figura 39A apresenta a separação da mistura de fármacos na fase SiAl(PEO), que se mostrou eficiente com boa retenção dos compostos, registrando um tempo total de análise de 15 min. A retenção dos compostos foi, provavelmente, governada por mecanismos mistos de interação hidrofóbica/hidrofílica, requerendo uma fase móvel com maior porcentagem de solvente orgânico em sua composição para a eluição dos fármacos da camada polimérica da fase SiAl(PEO). Essa interação mais forte pode ser justificada pela condição de neutralidade das moléculas dos fármacos em pH 10, impedindo a ocorrência de interações por troca iônica, que levaria a picos com alto fator de assimetria. Adicionalmente, observa-se a capacidade da fase SiAl(PEO) em separar substâncias com diferença de um grupo metila, caracterizada pela mistura de Tanaka, como é o caso da nortriptilina e amitriptilina. A Figura 39B apresenta o cromatograma da mistura de antidepressivos pela fase C<sub>18</sub> empregando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v). Os compostos da mistura de antidepressivos, nessa condição de fase móvel, encontram-se majoritariamente protonados (carregados positivamente), fazendo com que sua interação com a fase estacionária seja reduzida, em especial, por se tratar de uma fase altamente hidrofóbica, como a C<sub>18</sub>. Desta forma, a separação dos compostos não ocorreu na fase C<sub>18</sub>, gerando um único pico no cromatograma. A solução

neste caso, seria aumentar a alcalinidade da fase móvel para a neutralização das cargas das moléculas dos fármacos, no entanto, o pH da fase móvel ficaria em uma condição crítica para fases quimicamente ligadas a base de sílica, podendo levá-la a uma rápida degradação, o que não ocorre com fases estacionárias recobertas com camadas poliméricas.

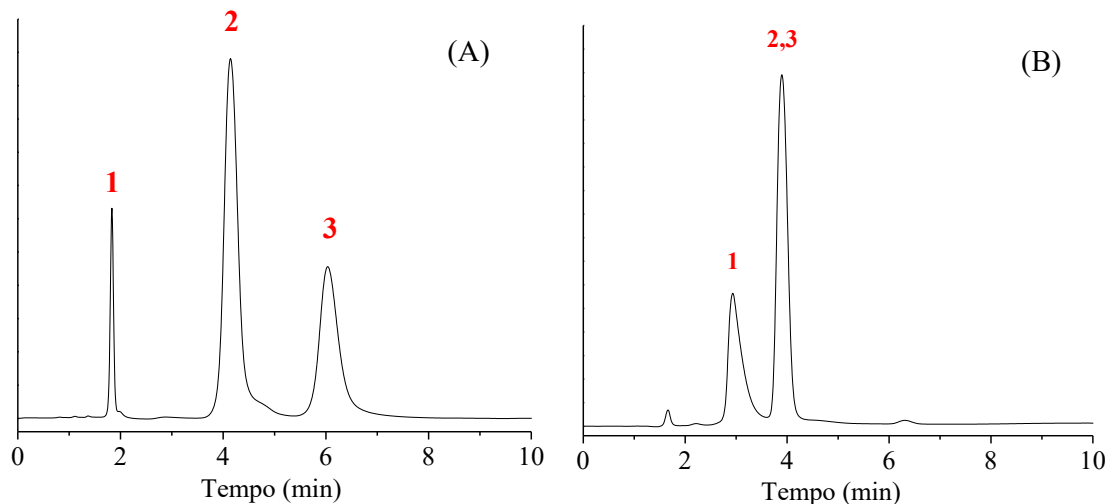
A segunda mistura de fármacos analisadas correspondeu a três anestésicos: benzocaína, lidocaína e tetracaína, que são moléculas com um caráter mais polar que a mistura de antidepressivos e devido a basicidade dessas moléculas é necessário a utilização de fases móveis alcalinas para garantir que as mesmas estejam majoritariamente neutras durante o processo de separação, favorecendo a retenção nas fases estacionárias avaliadas. A estrutura dos anestésicos se encontra na Figura 40.

Figura 40. Estruturas moleculares dos compostos: (A) benzocaína, (B) lidocaína e (C) tetracaína.



Para separação da mistura de anestésicos pela fase SiAl(PEO) foi empregada uma fase móvel alcalina MeOH:solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> e pH 10 (40:60, v/v) e para a separação pela coluna C<sub>18</sub> comercial foi empregada uma fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v), para preservar a integridade da coluna. Os cromatogramas obtidos para esta mistura estão apresentados na Figura 41.

Figura 41. Cromatogramas da mistura de anestésicos pelas fases (A) SiAl(PEO) #9 e (B) C<sub>18</sub> comercial. Condições de análise: (A) Fase móvel MeOH:solução tampão fosfato a 25 mmol L<sup>-1</sup> e pH 10 (40:60, v/v). (B) Fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60, v/v). Compostos: 1- tetracaína, 2- benzocaína e 3- lidocaína.



Através dos cromatogramas apresentados na Figura 41A é possível observar a separação total dos anestésicos pela fase SiAl(PEO), empregando um maior percentual de componente aquoso na fase móvel, o mesmo não ocorrendo para a fase comercial, que não foi capaz de resolver os picos da benzocaína e lidocaína. Assim, a fase SiAl(PEO) se mostrou eficaz na separação de compostos básicos, sob condições drásticas de fase móvel quando comparada a fase comercial quimicamente ligada. A separação em meio básico, além de neutralizar a maioria das moléculas dos fármacos, garantem uma interação mista hidrofóbica/hidrofílica dos compostos com a fase estacionária, promovendo uma maior retenção desses e, conseqüentemente, a possibilidade de separar a mistura pela interação diferencial entre solutos e fase estacionária. A ordem de eluição dos compostos na fase SiAl(PEO) foi equivalente à modalidade de fase reversa, ou seja, compostos mais apolares são retidos mais fortemente que compostos menos apolares, porém, demandou de maior porcentagem de componente aquoso na composição da fase móvel, indicando potencialidade do material produzido para ser aplicada nessa modalidade, com a vantagem de reduzir o volume de resíduo orgânico gerado na CLAE.

## 5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a imobilização do PEO sobre o suporte de sílica aluminizada na forma de uma camada fisicamente adsorvida se mostrou eficaz, mesmo sem a evidência de formação de ligação química entre grupos ativos da superfície do suporte e do copolímero. A caracterização físico-química da fase SiAl(PEO) indicou a presença de bandas referentes ao estiramento C-O-C e C-H proveniente do PEO na fase estacionária. A microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva permitiu quantificar o teor de alumina no suporte, bem como avaliar que a morfologia das partículas das fases estacionárias SiAl(PEO) se manteve adequada para finalidades cromatográficas. Aplicando-se o planejamento experimental, foi possível observar que o efeito da carga polimérica de PEO é maior que o efeito da temperatura de imobilização no preparo da fase estacionária, e que a condição de imobilização do PEO sobre a sílica aluminizada que produz o material com melhor recobrimento polimérico é obtida quando a carga polimérica foi de 50 % (m/m) e temperatura de imobilização térmica de 135 °C.

As caracterizações cromatográficas indicaram que a fase SiAl(PEO) possui propriedades de retenção que levam às separações dos compostos na modalidade de fase reversa, na qual compostos polares eluem mais rapidamente que os apolares. Concluiu-se também que as fases SiAl(PEO) necessitam de fases móveis mais aquosas para a separação dos componentes polares ou apolares. Essa característica está associada a característica mais polar do bloco polióxido de etileno da fase SiAl(PEO) que fornece uma seletividade diferenciada para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Apesar da fase SiAl(PEO) não apresentar ligações químicas entre o PEO e a sílica aluminizada, os parâmetros cromatográficos, como tempo de retenção e área de pico, apresentam estabilidade adequada com a passagem contínua de fase móvel. Além disso, as características mais polares da superfície da fase SiAl(PEO) possibilitou uma separação adequada de misturas de agrotóxicos e de fármacos, que apresentam características polares, requerendo fases móveis com mais de 70% de água ou ajustes de pH fora da faixa de estabilidade dos materiais comerciais. Essa condição se apresenta viável para o material produzido, uma vez que a estabilidade química em condições drásticas de fases móveis foi muito maior que de fases comerciais quimicamente ligadas a base de sílica. Esta estabilidade pode ser atribuída à contribuição das nanopartículas de alumina que revestiram o suporte cromatográfico empregado na fase estacionária. Assim, pode-se concluir que o material obtido neste trabalho

apresenta uma seletividade adequada para separação de compostos polares sem a necessidade de uso de grandes volumes de solvente orgânico na fase móvel, com elevada estabilidade química, inclusive em condições alcalinas de fase móvel, além de realizar separações com boa reprodutibilidade de análise e no modo de eluição por gradiente.

## REFERÊNCIAS

AHMED, A.; MYERS, P.; ZHANG, H. Synthesis of Nanospheres-on-Microsphere Silica with Tunable Shell Morphology and Mesoporosity for Improved HPLC. **Langmuir**, v. 30, p. 12190-12199, 2014. <https://doi.org/10.1021/la503015x>

AKPOLAT, L.B.; ÇAKIR, B.A.; TOPEL, Ö.; HODA, N. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by self-assembling reverse micelle cores of PS-b-PAA for functional textile applications. **Materials Research Bulletin**, v. 64, p. 117-122, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.11.028>

ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography 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)

ANAZAWA, T.A.; JARDIM, I.C.S.F. Polymethyloctylsiloxane adsorbed on porous silica as a packing material for reversed-phase high-performance liquid-chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v.17, p. 1265-1279, 1994. <https://doi.org/10.1080/10826079408013761>

BACHMANN, S.; MELO, L.F.C.; SILVA, R.B.; ANAZAWA, T.A.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H.; ALBERT, K. Synthesis and solid-state NMR investigations of radiation-immobilized polysiloxanes on bare, titanium-grafted, and zirconium-grafted silicas. **Chemical Materials**, v.13, p. 1874-1879, 2001. <https://doi.org/10.1021/cm001179f>

BERTHOD, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. **Journal of Chromatography A**, v. 549, p. 1-28, 1991. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)91415-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)91415-8)

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. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, p. 12-34, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.030>

BORGES, E.M.; COLLINS, C.H. Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4378-4388, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.007>

BORGES, E.M.; EUERBY, M.R.; COLLINS C.H. Characterization of a mixed-mode reversedphase/cation-exchange stationary phase prepared by thermal immobilization of poly (dimethylsiloxane) onto the surface of silica. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2043-2045, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5674-z>

BOTTOLI, C.B.G.; VIGNA, C.R.M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica-poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 217-223, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.107>

BUSZEWSKI, B.; JEZERSKA, M.; WELNIAK, M.; BEREK, D. Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis. **Journal of Separation Science**, v. 21, n. 5, p. 267-281, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4168\(19980501\)21:5<267::aid-jhrc267>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-4168(19980501)21:5<267::aid-jhrc267>3.0.co;2-7)

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 231-247, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>

CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. **Advances in Colloids and Interface Science**, v.110, p. 49-74, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2004.02.003>



- CARVALHO, G. O. ; Collins, C. H. ; FARIA, A. M. . Self-Immobilization of Poly(methyltetradecylsiloxane) onto Metalized Silica Particles as Stationary Phases for HPLC. **Journal of the Brazilian Chemical Society** , v. 27, p. 1297-1304, 2016. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160028>
- 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 964, p. 195-202, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.013>
- CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 23-41, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.098>
- 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>
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.
- DIAS FILHO, N. L.; CARMO, D. R. Adsorption on Silica, Alumina and Related Surfaces. In: Hubbard, A. T. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. Marcel Dekker, New York, N. J., p. 1-20, 2004. <https://doi.org/10.1081/e-escs3-120000140>
- 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>
- DUN, H.; ZHANG, W.; WEI, Y.; XIUQING, S.; LI, Y.; CHEN, L. Layer-by-layer self-assembly of multilayer zirconia nanoparticles on silica spheres for HPLC packings. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 5016-5023, 2004. <https://doi.org/10.1021/ac030389j>
- ENGELHARDT, H.; BLAY, 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**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 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. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 51-59, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.032>

FARIA, A.M.; TONHI, E.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Stability studies of stationary phases from poly(methyltetradecylsiloxane) sorbed and immobilized onto metalized and unmodified silicas. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 1844-1851, 2007. DOI: 10.1002/jssc.200700027

GE, J.; LI, Y.; CHEN, L. Characterization of TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> based stationary phase for RP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology*, v. 29, p. 2329-2339, 2006. <https://doi.org/10.1080/10826070600864700>

GE, J.; ZHAO, L.; CHEN, L.; SHI, Y. Titanium-Coated Silica Spheres Prepared by Self-Assembly Technique for Use as HPLC Packing. *Journal of Chromatographic Science*, v. 48, p. 29-34, 2010. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.1.29>

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**, 2<sup>a</sup> ed., London: Academic Press, 1982. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19820861019>

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. *Journal Chromatography A*, v. 1217, p.683-688, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.004>

HAKY, J.E.; VEMULAPALLI, S.; WIESERMAN, L.F. Comparison of octadecyl-bonded alumina and silica for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 505, p. 307-318, 1990. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)93046-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)93046-8)

HAMEED, B. H.; EL-KHAIARY, M. I. Kinetics and equilibrium studies of malachite green adsorption on rice straw-derived char. *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, p 701-708, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.019>

HORDERN, B.K. Chemistry of alumina, reactions in aqueous solution and its application in water treatment. *Advanced in Colloids and Interface Sciences*, v. 110, p. 19-48, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2004.02.002>

JARAMILLO, N.; PAUCAR, C.; GARCÍA, C. Influence of the reaction time and the Triton x-100/Cyclohexane/Methanol/H<sub>2</sub>O ratio on the morphology and size of silica nanoparticles synthesized via sol-gel assisted by reverse micelle microemulsion. *Journal of Materials Science*, v. 49, p. 3400-3406, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8049-y>

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. *Microchemical Journal*, v. 77, p. 191-198, 2004. <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. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 2917-2929, 2010. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000313>

JARONIEC, C.P.; JARONIEC, M.; KRUK, M. Comparative studies of structural and surface properties of porous inorganic oxides used in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 797, p. 93-102, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00998-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00998-9)

KAMITSOS, E.I.; PATSIS, A.P.; KORDAS, G. Infrared-reflectance spectra of heat-treated, Sol-gel derived silica. *Physical Reviews B*, v. 48, p. 12499-12505, 1993. <https://doi.org/10.1103/physrevb.48.12499>

KAZOKA, H. Analysis of purines and pyrimidines by mixed partition-adsorption normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 942, p 1-10, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01397-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01397-8)

KIMATA, K.; IWAGUCHI, K.; ONISHI, S.; JINNO, K.; EKSTEEN, R.; HOSOYA, K.; ARAKI, M.; TANAKA, N. Chromatographic characterization of silica-C18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. **Journal of Chromatography Science**, 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. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 9-21, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.057>

KURGANOV, A.; DAVANKOV, V.; ISAGEVA, T.; UNGER, K.; EISENBEISS, F. Characterization of Covalently Bonded and Adsorbed Polymer Coatings on Silica, Alumina and Zirconia by Means of Physico-Chemical and Chromatographic Methods. **Journal of Chromatography A**, v. 660, p.97, 1994. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85103-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85103-4)

KURGANOV, A.; TRÜDINGER, U.; ISAEVA, T.; UNGER, K.K. Native and modified alumina, titania and zirconia in normal and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 42, p. 217-222, 2002. <https://doi.org/10.1007/bf02269656>

MAN, P.P.; PELTRE, M. J.; BHARTOMEUF, D. Nuclear Magnetic Resonance Study of the Dealumination of an Amorphous Silica-Alumina Catalyst. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions**, v. 89, p. 1599-1602, 1990. <https://doi.org/10.1039/ft9908601599>

MEYER, V.R., **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5th ed. Chichester: Wiley, p. 426, 2010. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1749-9>

MIRJALILI, F.; HASMALIZA, M.; ABDULLAH, L.C. Size-controlled synthesis of nano  $\alpha$ -alumina particles through the sol-gel method. **Ceramics International**, v. 36, p. 1253-1257, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.01.009>

NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; CARR, P.W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 1-30, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.052>

NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; MCNEFF, C.V.; MCCORMICK, A.; CARR, P.W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 31-62, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.050>

PARIDA, K. M.; PRADHAN, A. C.; DAS, J.; SAHU, N. Synthesis and characterization of nano-sized porous gamma-alumina by control precipitation method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 113, p. 244-248, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.07.076>

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. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2001-2007, 2009. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900272>

PESEK, J. J.; SANDOVAL, J. E.; SU, M. New alumina-based stationary phases for high-performance liquid chromatography: Synthesis by olefin hydrosilylation on a silicon hydride-modified alumina intermediate. **Journal of Chromatography A**, v. 630, p. 95-103, 1993. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80444-d](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80444-d)

PESEK, J.J.; MATYSKA, M.T. Modified aluminas as chromatographic supports for highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 1-11, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00176-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00176-x)

PETRO, M.; BEREK, D. Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 37, p. 549-561, 1993. <https://doi.org/10.1007/bf02275796>

- PLOTKA, J.; TOBISZEWSKI, M.; SULEJ, A.M; KUPSKA, M.; GÓRECKI, T.; NAMIÉŚNIK, J. Green Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 1-20, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>
- RANA, S.; PHILIP, J.; RAJ, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, p. 264-269, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.06.029>
- ROJO, D.; BARBAS, C.; RUPÉRE, F.J. LC-MS metabolomics of polar compounds. **Bioanalysis**, v. 4, p. 1235-1243, 2012. <https://doi.org/10.4155/bio.12.100>
- SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Preparation and characterization of a poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica stationary phase for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 248-256, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.073>
- SILVEIRA, J.L.R.; DIB, S.R.; FARIA, A.M. New support for reversed-phase high-performance liquid chromatography based on aluminized silica. **Analytical Sciences**, v. 35, p. 285-291, 2014. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.285>
- 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 7-9, 2002. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532002000100002>
- TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, p. 808-818, 2001. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422001000600019>
- TONHI, E.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 87-94, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.110>
- TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases Estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseados em superfície de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000400017>
- VAN DER VOORT, P.; VANSANT, E.F. Silylation of the Silica Surface A Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, p. 2723-2752, 1996. <https://doi.org/10.1080/10826079608015107>
- VIGNA, C.R.M. **Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- VIGNA, C.R.M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Preparation of stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography using thermal treatments at high temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 60-67, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.007>
- WELDU, G.K.; SONG, H.; Van SCHEPDAEL, A.; CABOOTER, D.; ADAMS, E. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 142-154, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.015>

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 1-39, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/s0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/s0927-7757(00)00556-2)

## ANEXO

Equações utilizadas para calcular parâmetros cromatográficos a partir dos picos dos compostos obtidos nos cromatogramas:

Fator de retenção: 
$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Fator de assimetria: 
$$As_{10\%} = \frac{CB}{AC}$$

Número de pratos: 
$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Resolução: 
$$R_s = 1,17 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h2} + w_{h1})}$$

Em que:  $k$  = fator de retenção;  $t_R$  = tempo de retenção de um determinado composto;  $t_M$  = é o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária;  $As_{10\%}$  = fator de assimetria a 10 % da base do pico;  $N$  = número de pratos de uma coluna;  $w_h$  = largura do pico a uma altura de 50 % da sua base (ou largura do pico à meia altura); e  $R_s$  = resolução.

A simbologia pode ser mais bem compreendida pela análise dos cromatogramas nas Figuras A1 e A2.

*Figura A1. Ilustração de um cromatograma de separação por cromatografia líquida de alta eficiência e a medição das informações dos picos registrados para obtenção dos parâmetros cromatográficos.*

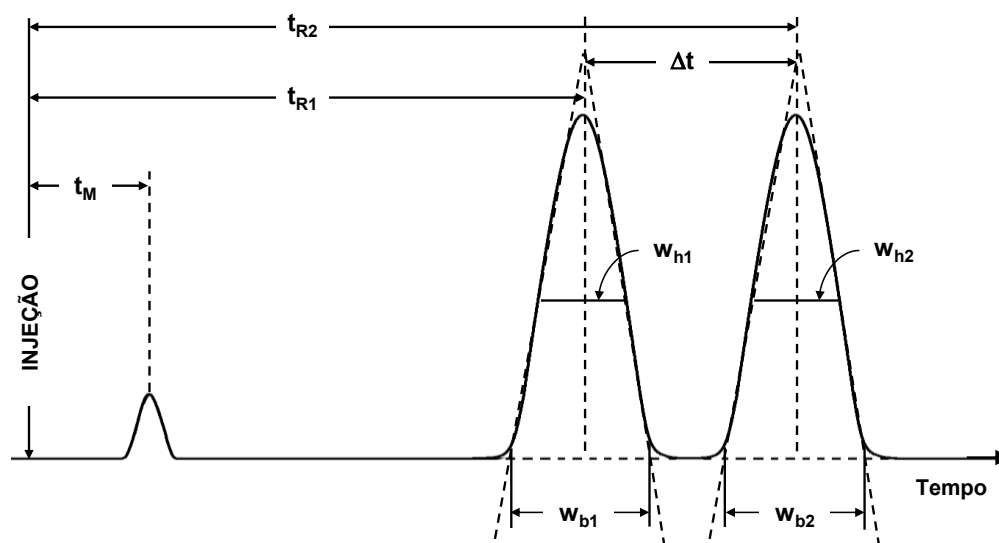


Figura A2. Ilustração de um cromatograma de separação por cromatografia líquida de alta eficiência e a medição do pico registrado para obtenção do fator de assimetria.

