



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã, CEP 38304-402, Ituiutaba / MG



VERÔNICA DOS SANTOS GAMA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DE
POLI(GLICIDOXIPROPILMETILSILOXANO) SOBRE SÍLICA NO
PREPARO DE FASE ESTACIONÁRIA POLAR PARA CLAE**

ITUIUTABA-MG

2017

VERÔNICA DOS SANTOS GAMA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DE
POLI(GLICIDOXIPROPILMETILSILOXANO) SOBRE SÍLICA NO
PREPARO DE FASE ESTACIONÁRIA POLAR PARA CLAE**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à
Comissão Avaliadora como parte das exigências do
Curso de Graduação em Química: Bacharelado, da
Faculdade de Ciências Integradas do Pontal da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA-MG

2017

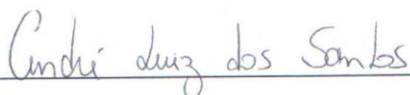
VERÔNICA DOS SANTOS GAMA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DE
POLI(GLICIDOXIPROPILMETILSILOXANO) SOBRE SÍLICA NO
PREPARO DE FASE ESTACIONÁRIA POLAR PARA CLAE**

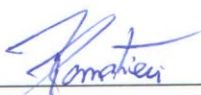
Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

15 de dezembro de 2017

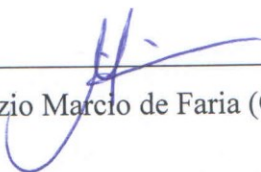
COMISSÃO AVALIADORA



Prof. Dr. André Luiz dos Santos



Prof. Dr. Rodrigo Barroso Panatieri



Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Valdirene e Ronaldo, aos meus irmãos, a minha vó Maria do Rosário (in memoriam) e ao meu amado Uilian, pelo amor, carinho e por me ensinarem que é sempre fazendo o meu melhor que se atingem os objetivos. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças para que vencesse meus próprios limites;

Agradeço aos meus pais que estiveram sempre ao meu lado, por terem acreditado e confiado em mim e a quem dedico essa conquista;

Ao meu namorado Uílian, pela cumplicidade, companheirismo, pela presença nos momentos de alegria e pelas palavras de incentivo que me deram força nos momentos difíceis;

Aos professores do curso de Química da FACIP/UFU, por compartilhar comigo todos os seus conhecimentos e experiências, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Anizio Márcio de Faria, primeiramente pelo aceite em me orientar e por estar sempre disposto a me ajudar em quaisquer que eram as minhas dificuldades. Agradeço por tudo que me ensinou, pela paciência que demonstrou e por tudo que aprendi com e graças a ele;

Ao grupo de pesquisas em cromatografia CROMAT da FACIP/UFU, que me ensinou bastante sobre cooperação, pelos incentivos, troca de ideias, companhia e onde adquiri grande quantidade de experiências para a vida;

Aos amigos de faculdade, por tudo que compartilhamos e aprendemos juntos. Em especial ao Allyson, pois sempre que precisei pude contar com sua ajuda; À Andréia e à Maria Cecília, irmãs que a vida me deu de presente. A amizade e o companheirismo de vocês foram essenciais!

Aos amigos e companheiros de graduação, Lorena, Marcos, Andressa, Diele, Carlão, Luiz Fernando, Mirielle, Mirianne, Andreza, Lauro, Isabella e a todos com quem compartilhei momentos tão especiais e que estiveram comigo durante toda a trajetória.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada!

EPÍGRAFE

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”. (Cora Coralina)

RESUMO

Apesar do amplo campo de aplicação a cromatografia líquida no modo de fase reversa apresenta limitações na separação de algumas classes de compostos, em especial, os altamente polares, por apresentarem baixa retenção nas fases estacionárias convencionais, como a C₈ e a C₁₈ quimicamente ligadas. Visando contornar essa limitação, este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma fase estacionária com características polares com intuito de obter um material seletivo para compostos polares. A fase estacionária foi preparada a partir da imobilização térmica do poli(glicidoxipropilmetilsiloxano), PGPMS, sobre partículas de sílica, em que o grupamento glicidóxi forneceu as características desejadas para o material. A preparação da fase estacionária Si(PGPMS) foi otimizada empregando um planejamento fatorial e caracterizada físico-química e cromatograficamente. Com os resultados de caracterização físico-química obtidos por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear ²⁹Si e análise elementar, foi possível determinar: (i) a presença do PGPMS na fase através de bandas características no espectro de infravermelho, que o mesmo foi quantificado por análise elementar em termos de % C e que o PGPMS foi imobilizado quimicamente nos grupos silanóis da sílica. A caracterização morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e análise de área superficial e porosidade, mostrando que o suporte de sílica imobilizado com o polímero mantém as características de porosidade e alta área superficial na forma de partículas esféricas do suporte de sílica. O tratamento térmico do PGPMS sobre a sílica foi otimizado, resultando em temperatura e tempos ideais de imobilização de 90 °C por 12 h, respectivamente, tanto em termos de quantidade de polímero imobilizado quanto de desempenho de separação. As análises cromatográficas realizadas a partir da separação de misturas testes padrão resultaram em separações típicas da modalidade de fase reversa, com boa estabilidade da camada polimérica sobre a sílica, mantendo fixas as propriedades de retenção dos compostos após uso contínuo do material na separação das misturas. No estudo das propriedades de retenção da fase Si(PGPMS), observou-se interações bem intensas de substâncias ácidas, polares e básicas, indicando que a superfície polar, garantida pela presença do grupo glicidóxi, pode ser adequada para separação de misturas de compostos que normalmente não são retidos em fases estacionárias reversas comerciais.

Palavras-chave: CLAE, fase estacionária, otimização, poli(glicidoxipropilmetilsiloxano), tratamento térmico.

ABSTRACT

Despite the wide field of application, liquid chromatography without reverse phase mode presents limitations in the division of some classes of compounds, especially the highly polar ones, by branch of low retention in conventional stationary phases, such as C8 and C18 chemically bonded. Aiming to circumvent this limitation, this work presents the development of a stationary phase with polar characteristics to obtain a selective polar material. The stationary phase was prepared from the thermal immobilization of the poly(glycidoxypropylmethoxysiloxane), PGPMS, onto silica particles, where the glycidyloxy group provided as desired characteristics for the material. A preparation of the Si stationary phase (PGPMS) was optimized using a factorial design and characterized physicochemically and chromatographically. Compatibility with results of the physical-chemical characterization obtained by infrared spectroscopy, ^{29}Si nuclear magnetic resonance and elemental analysis, was designed to determine: (i) a presence of the PGPMS in the phase through characteristic bands in the infrared spectrum, which the was even quantified by elemental analysis in terms of %C and that PGPMS was chemically immobilized on the silanol silanol groups. A morphological characterization was performed by scanning electron microscopy and porous surface area analysis, showing the silica support immobilized with the polymer maintained as pore characteristics and high surface area in the form of spherical particles of the silica support. The heat treatment of PGPMS on silica was optimized, resulting in optimum temperature and immobilization times of 90°C for 12 h, respectively, in terms of the amount of immobilized polymer as well as the performance of separation. As chromatographic analyzes performed from the separation of standard testers mixtures resulted in typical separations of the reversed phase modality with good stability of the polymer layer on the silica, keeping them fixed as retention property of the products after the continuous use of the material in the separation of the mixtures. In the study of the Si phase retention good (PGPMS), background observations, safety measures, safety measures, guarantees of the presence of the glycidyloxy group, may be suitable for separating mixtures of content that are not normally retained in stationary phases reverse.

Keywords: HPLC, stationary phase, optimization, poly(glycidoxypropylmethoxysiloxane), thermal treatment.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASAP	Accelerated Surface Area and Porosimetry System
BET	Brummet, Elmer e Teller
CHN	Carbono, hidrogênio e nitrogênio
d_p	Diâmetro de poro
FE	Fase estacionária
FEQL	Fases estacionárias quimicamente ligadas
FM	Fase móvel
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
GPC	Gel permeation chromatography
HPLC	High-performance liquid chromatography
IP	Índice de polidispersividade
LC	Liquid chromatography
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP-LC	normal-phase liquid chromatography
PGPMS	poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano)
RP-LC	reversed-phase liquid chromatography
S_{BET}	Área superficial específica
SEM	Scanning electron microscopy
Si(PGPMS)	Fase estacionária baseada na imobilização térmica de PGPMS sobre sílica
TG	Análise termogravimétrica
V_p	Volume de poro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudo da temperatura e tempo de imobilização para o preparo de fases Si(PGPMS).	20
Tabela 2. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores.	24
Tabela 3. Porcentagem de carbono nas fases Si(PGPMS) preparadas sob condições diversas de temperatura e tempo de imobilização, seguindo o planejamento fatorial 2^2 .	32
Tabela 4. Área superficial e propriedades de poros das partículas de Si(PGPMS).	36
Tabela 5. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(PGPMS).	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa.	15
Figura 2. Estrutura química do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano).	17
Figura 3. Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas cromatográficas.	21
Figura 4. Estrutura química dos compostos presentes na mistura teste hidrofóbica.	23
Figura 5. Estrutura química dos compostos das misturas testes propostas por Tanaka e colaboradores.	25
Figura 6. (a) Perfil cromatográfico de GPC e (b) distribuição de massas molares para o PGPMs.	29
Figura 7. Curva TG em atmosfera oxidante para o PGPMs.	30
Figura 8. Espectro de absorção do PGPMs na região do infravermelho.	31
Figura 9. Superfície de porcentagens de carbono para as fases Si(PGPMs) de acordo com os tempos e temperaturas avaliados na imobilização do PGPMs sobre sílica.	33
Figura 10. Superfície de eficiências de colunas (N/m) para as fases Si(PGPMs) de acordo com os tempos e temperaturas avaliados na imobilização do PGPMs sobre sílica.	34
Figura 11. Imagens de SEM das partículas de Si(PGPMs) com ampliação de 700 vezes (a) e 10.000 vezes (b).	35
Figura 12. Espectros NMR de ^{29}Si da (a) sílica e da (b) fase Si(PGPMs).	37
Figura 13. Espectro de absorção no infravermelho (a) da sílica nua e (b) de uma fase Si(PGPMs) imobilizada termicamente.	38
Figura 14. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtidos pelas fases Si(PGPMs). Fase #1 a Fase #6. Condições cromatográficas: MeOH:H ₂ O (60:40, v/v); Vazão 0,4 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm.	40
Figura 15. Cromatograma da separação dos compostos da mistura teste hidrofóbica pela fase C ₁₈ comercial. Fase móvel MeOH:H ₂ O (80:20, v/v); vazão 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno.	41
Figura 16. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtidos pela fase Si(PGPMs) #5 após medidas consecutivas. Condições cromatográficas: MeOH:H ₂ O (60:40, v/v); Vazão 0,4 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm.	42

Figura 17. Gráfico radial das propriedades de retenção, de acordo com o protocolo de Tanaka, das fases Si(PGPMS) preparadas sob diferentes condições de imobilização. (a) Fase #1 até (f) Fase #6. _____

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Suportes cromatográficos	14
1.2 Imobilização polimérica sobre suporte cromatográfico	15
2 OBJETIVOS	18
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1 Reagentes e solventes	19
3.2 Preparação das fases Si(PGPMS)	19
3.2.1 Ativação da sílica cromatográfica	19
3.2.2 Preparação da fase Si(PGPMS) sorvida	19
3.2.3 Imobilização térmica do PGPMS sobre sílica	20
3.2.4 Enchimento das colunas cromatográficas com as fases Si(PGPMS)	21
3.3 Análise cromatográfica das fases Si(PGPMS)	22
3.3.1 Preparação das fases móveis	22
3.3.2 Avaliação das propriedades de retenção das fases Si(PGPMS)	22
3.3.2.1 Mistura hidrofóbica	23
3.3.2.2 Mistura teste de Tanaka	23
3.4 Caracterização físico-química do PGPMS e das fases Si(PGPMS)	25
3.4.1 Análise elementar	25
3.4.2 Análise termogravimétrica	26
3.4.3 Cromatografia de permeação em gel	26
3.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	27
3.4.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si	27
3.4.6 Microscopia eletrônica de varredura	27
3.4.7 Análise de área superficial e porosidade	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Caracterização físico-química do PGPMS	29
4.1.1 Cromatografia de permeação em gel	29
4.1.2 Análise termogravimétrica	30
4.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	31

4.2 Otimização do preparo das fases Si(PGPMS) imobilizadas termicamente	32
4.3 Caracterização morfológica e estrutural da fase Si(PGPMS)	35
<i>4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura</i>	35
<i>4.3.2 Área superficial e porosidade da fase Si(PGPMS)</i>	36
<i>4.3.3 Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si da fase Si(PGPMS)</i>	36
<i>4.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier da fase Si(PGPMS)</i>	37
4.4 Avaliação cromatográfica das fases Si(PGPMS)	39
<i>4.4.1 Mistura hidrofóbica</i>	39
<i>4.4.2 Estabilidade da camada polimérica de PGPMS imobilizada sobre a sílica</i>	42
<i>4.4.3 Mistura teste de Tanaka</i>	43
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) vem ocupando um lugar proeminente nos últimos 40 anos, dentre as técnicas mais utilizadas para fins analíticos, abrangendo tanto análises qualitativas como análises quantitativas. A HPLC é a técnica de separação mais abrangente e versátil para resolver misturas de compostos com as mais variadas estruturas químicas. Sendo assim, a cromatografia se caracteriza por ser um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes entre duas fases. (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

A HPLC possui uma importante subdivisão, sendo duas principais: a cromatografia líquida clássica (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a HPLC. A eluição na LC é propiciada pela ação da gravidade ou com aplicação da pressão reduzida, podendo reutilizar o recheio da coluna desde que seja recuperado o adsorvente. Na HPLC emprega-se uma coluna fechada de aço inox, na qual as partículas das fases estacionárias são menores e preenchem completamente a coluna, tornando necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel (DEGANI; CASS; VEIRA, 1998).

Na HPLC o processo cromatográfico consiste, basicamente, em uma fase móvel (FM) que se move através de uma fase estacionária (FE), carregando os componentes de uma mistura. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um desses componentes é seletivamente retido na fase estacionária. A fase móvel é bombeada sob alta pressão, porém a uma vazão controlada. Na técnica, uma pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna e até ao detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A técnica se divide em modalidades de acordo com os mecanismos de separação promovidos por suas fases móveis e fases estacionárias. As principais modalidades da HPLC são: a cromatografia em fase normal (NP-LC, do inglês *normal-phase liquid chromatography*), no qual emprega-se uma fase estacionária mais polar que a fase móvel, e; a cromatografia líquida em fase reversa (RP-LC, do inglês *reversed-phase liquid chromatography*), na qual a fase estacionária é constituída de uma camada fortemente apolar retida na superfície e poros de um suporte inorgânico, enquanto que a fase móvel emprega eluentes misturados com água (MEYER,

2010). Esta última modalidade possui uma grande aceitação, principalmente, devido à grande quantidade de substâncias que podem ser separadas com altas eficiência e rapidez.

A fase reversa apresenta algumas vantagens em relação à fase estacionária normal. As fases reversas utilizam como fase móvel, solventes menos tóxicos e mais baratos, que os solventes clorados empregados na fase normal, como água e metanol; tendem a adquirir rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; possuem boa reprodutibilidade dos tempos de retenção; possibilidade de eluição por gradiente, resultando em melhor separação e rapidez nas análises (TONHI *et al.*, 2002).

A fase estacionária é de extrema importância no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, pois juntamente com a eluição da fase móvel promove a separação de espécies de uma amostra, devido às diferentes interações. Fases estacionárias reversas, devido à inversão da seletividade com a introdução de grupos orgânicos sobre suporte de sílica, vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos em grande extensão (FARIA; JARDIM; COLLINS, 2009).

Dentre as formas de preparo de fase estacionária, as fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL) obtidas pelo processo de organossilanização apresentam melhor reprodutibilidade e melhor estabilidade hidrolítica e, portanto, é o método mais comum no preparo de fases estacionárias comerciais (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). No método por organossilanização é necessário inicialmente ativar os grupos ativos (silanóis) da superfície da sílica através de aquecimento, removendo moléculas de água presentes por ligações de hidrogênio. Após a ativação dos grupos reativos, promove-se a reação química entre os grupos hidroxilas e um agente silano, formando-se as fases estacionárias quimicamente ligadas do tipo siloxano (KIRKLAND, 2004).

Os agentes silanos que se ligam quimicamente aos grupos silanóis da sílica mais utilizados são o octadecilsilano (C_{18}) e o octilsilano (C_8) (TONHI *et al.*, 2002). A principal vantagem das fases do tipo siloxano é a estabilidade relativamente alta da ligação siloxano, Si-O-Si, entre o suporte de sílica e o agente organossilano, conferindo maior estabilidade hidrolítica à fase estacionária (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). O maior problema das reações de silanização da superfície da sílica e, por consequência, das fases quimicamente ligadas é que somente um número limitado de grupos silanóis (grupos ativos da superfície da sílica, Si-OH) reage devido ao impedimento estérico (KIRKLAND, 2004; ENGELHARDT; BLAY; SAAR, 2005). O impedimento estérico é gerado pelos volumosos agentes silanos (C_8 ou C_{18}) empregados na reação, que ocasionam a baixa concentração do ligante na superfície da sílica. Os silanóis que não reagem (silanóis residuais) são ácidos e podem alterar o mecanismo de retenção, contribuindo

para a retenção e desempenho indesejados, principalmente, de substâncias básicas, mas também de substâncias polares (KIRKLAND, 2004; ENGELHARDT; BLAY; SAAR, 2005).

1.1 Suportes cromatográficos

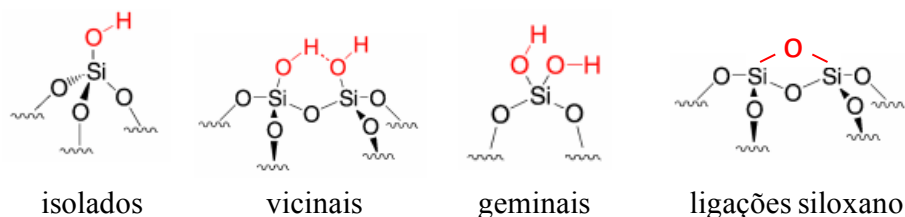
As fases estacionárias para RP-LC são normalmente constituídas de um suporte sólido revestido, através de ligação química ou recobrimento polimérico, por uma de um líquido com características mais apolares. São muitas as características desejáveis para que um suporte cromatográfico seja empregado no preparo de FE, tais como (MEYER, 2010):

- ✓ Ser suficientemente poroso, permitindo que o líquido seja absorvido pelos seus poros;
- ✓ Diâmetro de poro entre 5 e 100 nm, pois poros mais estreitos dificultam a transferência de massa podendo ocorrer efeitos por exclusão de tamanho, enquanto que poros mais 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 para aumentar a capacidade de aceitação da amostra;
- ✓ Resistência mecânica elevada, para que a FE seja capaz de resistir às altas pressões necessárias em RP-LC;
- ✓ Inércia química, para não reagir com os componentes da amostra.

Os primeiros materiais empregados como suporte cromatográfico foram os óxidos inorgânicos de silício (SiO_2 , sílica) e de alumínio (Al_2O_3 , alumina). A sílica tem sido o material preferido para a preparação das fases estacionárias para RP-LC, devido principalmente à sua facilidade de modificação superficial, possibilitando o preparo de diversos tipos de fases estacionárias reversas. Além disso, é comercialmente disponível em uma grande variedade de tamanho de partículas e formas (TONHI *et al.*, 2002).

A sílica na sua forma amorfa contém em sua superfície pelo menos três tipos de grupos silanóis (Figura 1), tais como: silanóis isolados, silanóis vicinais e silanóis geminais, que conferem ao material uma elevada acidez superficial (BERTHOD, 1991). Além destes grupos característicos, a sílica possui uma estrutura rígida devido à suas ligações siloxano (Si-O-Si) altamente estáveis.

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



Fonte: SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014.

Porém, a sílica apresenta algumas limitações como suporte cromatográfico: A primeira limitação se deve à sua utilização restrita a uma faixa de pH de 2 até 8 e, a segunda, refere à presença dos grupos silanóis residuais (que não foram totalmente modificados durante a preparação da fase reversa). Em meio ácido, quando o pH for menor que 2, os grupos orgânicos (camada da fase estacionária) ligados à sílica na fase reversa são mais facilmente lixiviados, pois as ligações $\equiv\text{Si-O-Si-C}$ susceptíveis à hidrólise ácida. Em meio básico, quando o pH estiver acima de 8, a sílica se converte a silicato que é solúvel em meio aquoso (fase móvel), promovendo a dissolução da sílica e, conseqüentemente, a perda da camada de fase estacionária que se encontra ligada ao suporte (SILVA *et al.*, 2004).

1.2 Imobilização polimérica sobre suporte cromatográfico

Na tentativa de se obter uma FE com uma maior proteção dos grupos silanóis na superfície da sílica e maior estabilidade frente à passagem de FM em condições básicas ou ácidas, novas estratégias de preparação de fases estacionárias vêm sendo desenvolvidas. Uma das estratégias bem-sucedida na preparação de fases estacionárias para HPLC de melhor recobrimento do suporte consiste em imobilizar polímeros orgânicos sobre as partículas de sílica (NASAL *et al.*, 1996, KURGANOV *et al.* 1996; JARDIM; COLLINS K; COLLINS C, 2004; FARIA, COLLINS, JARDIM, 2009). O principal objetivo deste procedimento é recobrir a superfície da sílica com uma fina camada do polímero e assim, bloqueando o acesso de solutos aos grupos silanóis do suporte cromatográfico (SILVA *et al.*, 2004).

A forma mais simples de preparação de fases recobertas com 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 apropriadamente dissolvido em um solvente, no qual ele seja completamente solúvel e, a esta

solução, é adicionada o óxido inorgânico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

A imobilização de polímeros sobre suportes cromatográficos tornou-se um método de grande importância no preparo de fases estacionárias para RP-LC (SILVA; COLLINS, 2012). Isto ocorre, uma vez que a imobilização de um polímero na superfície da sílica resulta em uma melhor proteção dos grupos ativos do suporte, já que o polímero recobre uma maior extensão da sua superfície. Desta forma, as FE se apresentam mais estáveis em uma faixa mais ampla de pH, pois a superfície do suporte estará melhor protegida do ataque da fase móvel, resultando em uma melhor separação de compostos (SANTOS, 2016).

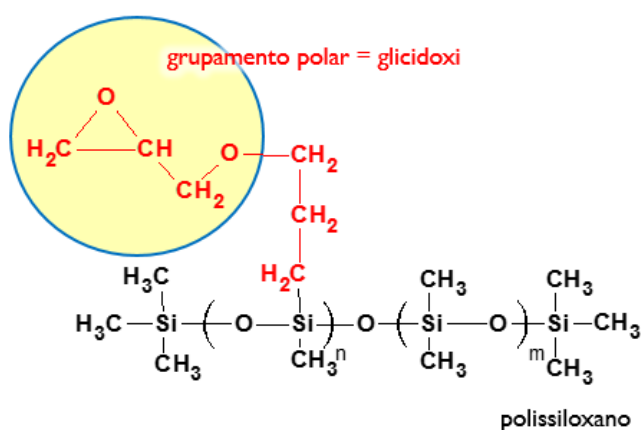
O tratamento térmico é um dos principais procedimentos de imobilização polimérica, que consiste no aquecimento, por condução de calor, do recipiente contendo o suporte cromatográfico e o polímero. Este tratamento térmico é empregado para acelerar a imobilização do polímero no suporte, auxiliando no processo de auto-imobilização (BOTTOLI *et al.*, 2004). A auto-imobilização é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário considerável período de tempo para que as moléculas do polímero se rearranjem de maneira a formarem uma camada estável e uniforme sobre a superfície do suporte cromatográfico (BOTTOLI, 2002).

Fases com recobrimento polimérico apresentam uma série de vantagens que as tornam extremamente atrativas para uso em RP-LC, tais como: melhor proteção dos silanóis residuais (sílica) ou de sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia, alumina), evitando interações com componentes da amostra; proteção eficaz da matriz do suporte inorgânico contra o ataque químico de fases móveis agressivas; maior facilidade de preparo; etc. Além disso, a seletividade destas fases depende essencialmente dos grupos funcionais do polímero imobilizado. Devido à disponibilidade, as fases recobertas com polímeros permitem o ajuste flexível da seletividade cromatográfica dentro de uma ampla faixa, dependendo apenas da escolha do polímero apropriado para a separação (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

Neste trabalho foi utilizado um copolímero pré-sintetizado, o poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) (PGPMS), Figura 2, que apresenta em sua estrutura monomérica um grupo glicidóxi da qual se espera proporcionar à FE uma seletividade adequada para separar substâncias polares. As substâncias polares apresentam dificuldade de retenção nas fases estacionárias reversas convencionais, uma vez que o C₁₈ se apresenta como um grupamento fortemente hidrofóbico, oferecendo pouca retenção para tais substâncias e consequentemente dificuldade de separação (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). O grupo glicidóxi do PGPMS é capaz de formar unidades de glicol por abertura hidrolítica do anel epóxi, formando cadeias de diferentes

comprimentos de óxido de polietileno (PEO) por polimerização. Os grupos epoxi reagem para formar cadeias de PEO a partir da foto-polimerização, pela indução de calor ou através de catalisadores básicos ou ácidos. Além disso, o anel epóxi do PGPMS pode sofrer abertura, a qual pode permitir a formação de um poli(óxido de etileno) sob condições apropriadas de fase móvel. A estrutura desse anel epóxi é formada por um átomo de oxigênio unido a dois átomos de carbono, que por sua vez estão unidos por uma ligação covalente (INNOCENZI *et al.*, 2009).

Figura 2. Estrutura química do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano).



Fonte: Própria autora.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi a preparação de uma fase estacionária que apresente características adequadas para separação de substâncias polares para cromatografia líquida de alta eficiência na modalidade de fase reversa (RP-LC). Para tal, o copolímero poli(glicidoxipropilmetil-*co*-dimetilsiloxano), Si(PGPMS), foi imobilizado termicamente sobre partículas de sílica como fase estacionária seletiva para substâncias polares. Para alcançar este objetivo algumas etapas foram realizadas, como:

- Caracterização do PGPMS como recobrimento polimérico para fases estacionárias para HPLC;
- Otimização das condições de preparo da fase Si(PGPMS);
- Caracterização físico-química da fase estacionária - Si(PGPMS) – por diferentes técnicas microscópicas e espectroscópicas de análise;
- Avaliação cromatográfica da fase Si(PGPMS) através da separação de protocolos de misturas testes padrão para caracterização de suas propriedades de retenção.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes

Inicialmente, para o teste de solubilidade do copolímero PGPMS foram utilizados os seguintes solventes como: hexano, isopropanol e clorofórmio todos grau PA. Para o preparo e a análise das fases estacionárias foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: sílica cromatográfica Chromosorb (Varian, Palo Alto, EUA), partículas de 5 μm de diâmetro; poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) da UnitedChem (Bristol, PA, EUA); tolueno grau espectroscópico; metanol grau HPLC, 99,5 % (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil); clorofórmio grau espectroscópico, 99 % (Tedia); água ultrapurificada a $18,3 \Omega \text{ cm}^{-1}$ obtida em um ultrapurificador MegaPurity modelo Mega ROUP (Equisul, Pelotas, Brasil). Foram utilizados para a caracterização cromatográfica das FE os compostos: uracila 99 %, benzeno 95 %, etilbenzeno 99,5 %, butilbenzeno 99,5 %, pentilbenzeno 99 %, *o*-terfenila 99 %, trifenileno 98 % e benzilamina 99 % todos adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil); cafeína 98 %, naftaleno 99 %, N,N-dimetilanilina 98 % e fenol 99,5 % adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Preparação das fases Si(PGPMS)

3.2.1 Ativação da sílica cromatográfica

Realizou-se a ativação da sílica com o objetivo de remover as moléculas de água adsorvidas no suporte, uma vez que este apresenta alta capacidade de adsorção de água em seus grupos silanós (-OH), deixando-os indisponíveis para a modificação eficiente para fase reversa. Foram pesados aproximadamente 5 g de sílica em um béquer, e este foi levado à mufla por 12 h a uma temperatura de 140 °C, para que todas as moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica pudessem ser removidas (ZHURAVLEV, 2000). Em seguida, colocou-se o béquer devidamente fechado com papel alumínio em um dessecador, sob vácuo, até o momento do uso.

3.2.2 Preparação da fase Si(PGPMS) sorvida

A fase estacionária foi preparada pela adição de 1,200 g de sílica pré-ativada a uma solução de PGPMS a 30% (m/v) em 15 mL de clorofórmio, deixando a mistura sob agitação

branda por 10 min. Logo após, a mistura foi colocada em banho ultrassom por mais 10 min para melhor contato do polímero com a sílica. Após o ultrassom, a mistura foi deixada sob agitação magnética por cerca de 2 h e 30 min. Passado esse período, desligou-se a agitação, deixando a mistura polímero e sílica em repouso, para que fosse evaporado totalmente o solvente por cerca de 5 dias. O material obtido ao final do repouso foi denominado de fase Si(PGPMS) sorvida.

3.2.3 Imobilização térmica do PGPMS sobre sílica

O tempo e a temperatura de imobilização são fatores que normalmente afetam a fixação do polímero sobre a superfície do suporte cromatográfico na preparação de fases estacionárias recobertas com polímeros. Com isso, foram determinadas as melhores condições experimentais para obtenção do material de fase Si(PGPMS) que melhor separe constituintes de uma mistura padrão. Para isso, foram avaliadas três condições de temperatura e duas condições de tempo de imobilização, que estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estudo da temperatura e tempo de imobilização para o preparo de fases Si(PGPMS).

Fase estacionária	Temperatura (°C)	Tempo de imobilização (h)
Si(PGPMS) #1	80	10
Si(PGPMS) #2	120	10
Si(PGPMS) #3	160	10
Si(PGPMS) #4	80	20
Si(PGPMS) #5	120	20
Si(PGPMS) #6	160	20

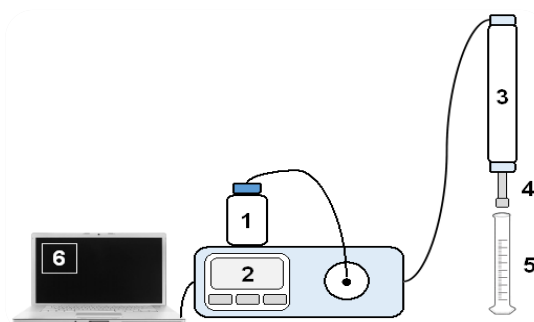
Frações da fase Si(PGPMS) sorvida foram levadas para uma mufla, ajustando as condições de aquecimento de acordo com as condições da Tabela 1. Após a imobilização térmica, o polímero que não foi imobilizado sobre a sílica foi removido da fase estacionária com lavagem sucessivas com tolueno, separando o material sólido por centrifugação a 2500 rpm por 4 min e descartando o sobrenadante. O procedimento de centrifugação foi repetido por 3 vezes. O sólido da fase Si(PGPMS) imobilizada termicamente foi seco sob aquecimento em estufa a 60 °C por 1 h.

3.2.4 Enchimento das colunas cromatográficas com as fases Si(PGPMS)

Para o enchimento da coluna, foi preparada uma suspensão a 5 % (m/v) das FE Si(PGPMS) imobilizadas termicamente em clorofórmio. A suspensão foi agitada em agitador vórtex por 2 min e, em seguida, levada ao banho ultrassom por 10 min, antes de ser submetida ao sistema de enchimento.

A suspensão da fase Si(PGPMS) foi então submetida ao procedimento de enchimento da coluna cromatográfica, de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas cromatográficas.



Fonte: Própria autora

Para o enchimento de colunas cromatográficas com as fases Si(PGPMS), as suspensões foram transferidas para o sistema de enchimento de colunas. Resumidamente, 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⁻¹. O reservatório de suspensão (3) contendo a coluna cromatográfica de 50 milímetros de comprimento (4), devidamente acoplada à sua extremidade. O volume do reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio) devidamente filtrado. Fechou-se a extremidade superior do reservatório de solvente pelo qual foi adicionada a FE. 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 Si(PGPMS) para o interior da coluna cromatográfica. A fase Si(PGPMS) 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 80 mL de solvente, que foram recolhidos em uma proveta de 100 mL (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.

A coluna cromatográfica previamente recheada foi conectada ao equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência para condicionamento, passando fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50 (v/v) vazão 0,4 mL min⁻¹, por cerca de 60 minutos. A coluna foi conectada apenas à bomba cromatográfica e não ao detector, pois nesta etapa, resíduos provenientes do enchimento, como polímeros removidos da sílica poderão ser removidos da coluna e entupir a cela de detecção do detector.

3.3 Análise cromatográfica das fases Si(PGPMS)

Todas as medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Varian (Palo Alto, CA, EUA) com sistema binário de bombas modelo ProStar 210, detector de absorvância ProStar 325 e injetor manual Reodhyne 7725i com alça de amostragem de 20 µL.

3.3.1 Preparação das fases móveis

Os solventes constituintes da fase móvel (água e metanol) foram filtrados e seus volumes foram individualmente, utilizando-se de um sistema de filtração de fase móvel e uma membrana de Nylon de 45 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados em frascos separados e deixados por 5 minutos em banho ultrassom, para serem desgaseificados. Após desgaseificados, os solventes foram dispostos nos reservatórios para fase móvel do sistema cromatográfico.

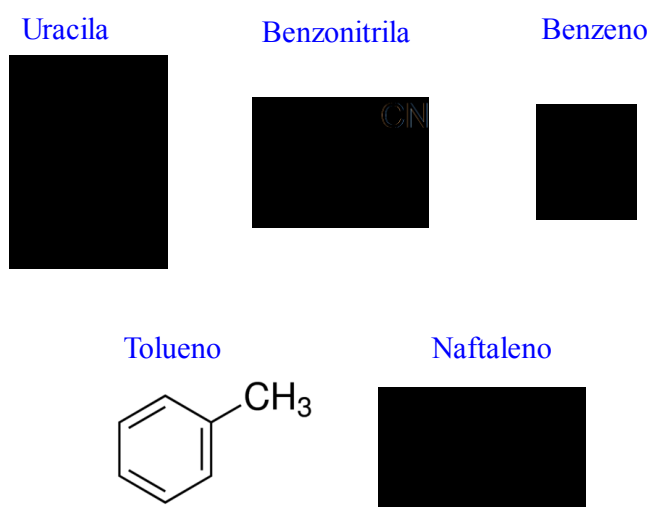
3.3.2 Avaliação das propriedades de retenção das fases Si(PGPMS)

A avaliação cromatográfica das fases estacionárias Si(PGPMS), neste trabalho, foi realizada com uma mistura teste de compostos padrão. As proporções dos solventes ou vazão da fase móvel foram alteradas conforme a necessidade para melhor resolução dos picos no cromatograma. As misturas testes padrão que foram empregadas para a avaliação da fase Si(PGPMS) consistem em protocolos de caracterização das propriedades de retenção de FE reversas.

3.3.2.1 Mistura hidrofóbica

As colunas cromatográficas recheadas com as fases Si(PGPMS) foram avaliadas através da separação de uma mistura hidrofóbica composta por uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno (REFERENCIA). Esta mistura é utilizada para avaliar a seletividade e o mecanismo de separação da fase estacionária. Na Figura 4, estão apresentadas todas as estruturas químicas dos compostos presentes na mistura teste hidrofóbica.

Figura 4. Estrutura química dos compostos presentes na mistura teste hidrofóbica.



3.3.2.2 Mistura teste de Tanaka

O protocolo desenvolvido por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989) é o mais empregado para caracterização de preparações de fases estacionárias quanto às suas propriedades de retenção. Neste protocolo, há quatro misturas testes, cada uma com composição de fase móvel específica e que avalia diferentes características das FE. Todas as misturas foram analisadas empregando uma vazão de fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$. As misturas e suas respectivas fases móveis estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores.

MISTURAS	COMPOSTOS	CONDIÇÕES DE ANÁLISE
M. Tanaka 1	uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, <i>o</i> -terfenilo e trifenileno	MeOH:H ₂ O, 80:20 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C
M. Tanaka 2	uracila, cafeína e fenol	MeOH:H ₂ O, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C
M. Tanaka 3	uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato pH 7,60, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C
M. Tanaka 4	uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato a pH 2,70, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C

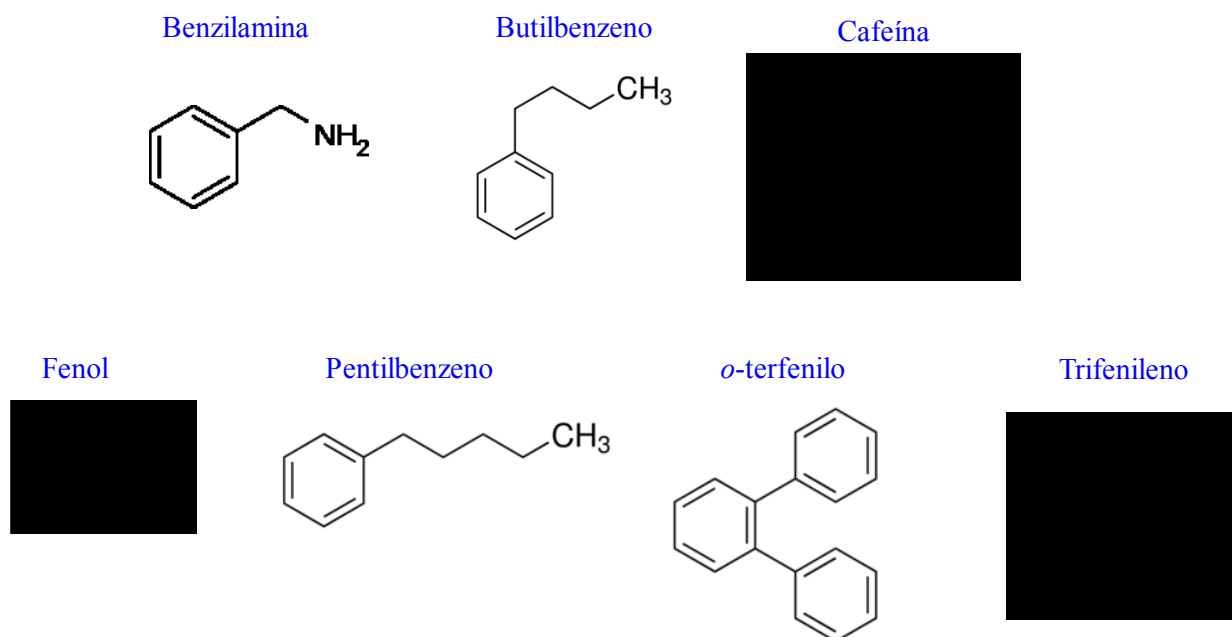
No protocolo proposto por Tanaka e colaboradores as propriedades das fases estacionárias avaliadas foram:

- Hidrofobicidade (k_{PB}) – Medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno (k_{PB}) na mistura 1. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da camada orgânica da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento da superfície da fase estacionária, uma vez que quanto maior a quantidade de polímero, maior o valor de k_{PB} .
- Seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) – Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB}/k_{BB}$. Esta é uma medida da capacidade da fase em diferenciar compostos orgânicos durante a separação, pois a seletividade hidrofóbica mede o grau de separação de alquilbenzenos distintos por um grupo CH_2 .
- Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$) – Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$. O $\alpha_{T/O}$ mede a capacidade da fase estacionária em separar duas substâncias com estruturas químicas similares, porém que diferem quanto à sua geometria e disposição espacial.
- Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$) – Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C/k_P$. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis na fase estacionária que estão aptos a formarem ligações de hidrogênio com componentes da amostra.
- Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$) – Propriedade medida pela razão entre os 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 entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70} = k_B/k_P$, empregando fase

móvel tamponada em pH 2,70. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária.

Na Figura 5 estão apresentadas as estruturas químicas dos compostos analisados nas misturas testes propostas por Tanaka (KIMATA *et al.*, 1989).

Figura 5. Estrutura química dos compostos das misturas testes propostas por Tanaka e colaboradores.



3.4 Caracterização físico-química do PGPMS e das fases Si(PGPMS)

As fases estacionárias preparadas a partir da imobilização do PGPMS sobre as partículas de sílica foram caracterizadas físico-quimicamente por diferentes técnicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*), Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*), Análise de Área Superficial e Porosidade (ASAP, do inglês *Accelerated Surface Area and Porosimetry System*), Análise Elementar (CHN), Análise Termogravimétrica (TG, do inglês *thermogravimetric analysis*), Cromatografia de Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel permeation chromatography*), além de Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR, do inglês *Fourier-transform Infrared spectroscopy*).

3.4.1 Análise elementar

Todas as fases Si(PGPMS) produzidas foram submetidas à análise elementar para a determinação da percentagem de carbono após a etapa 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 PGPMS. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco, cerca de 5 mg de fase estacionária, para converter os elementos da amostra em gases, como CO₂, H₂O e N₂. Estes gases são controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume. 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. Essa medida foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU.

3.4.2 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do PGPMS foi avaliada por análise termogravimétrica, na qual cerca de 5 mg de amostra foram colocados em uma microbalança no analisador térmico e submetidos a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas sob atmosfera oxidante em um analisador termogravimétrico, relacionando a perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Esta medida foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ/UFU).

3.4.3 Cromatografia de permeação em gel

A cromatografia por exclusão, na modalidade de permeação em gel, avalia as características do polímero, fornecendo informações sobre a distribuição da massa molar e o índice de polidispersividade. Essas medidas foram necessárias para se determinar as características do PGPMS. Foi empregada uma coluna American Polymer Standard Corporation® 1.000-20.000, com dimensões de 300 mm de comprimento por 7,8 mm de diâmetro interno. Para construção da curva analítica foram empregados padrões de poliestireno de massas moleculares $5,0 \times 10^2$; $2,6 \times 10^3$; $6,4 \times 10^3$; $1,8 \times 10^4$ e $4,3 \times 10^4$ dissolvidos em tetraidrofurano. Foram injetados 250 µL de cada padrão, empregando como fase móvel tetraidrofurano a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e uma temperatura de 40 °C para a coluna e para o detector por índice de refração. Para a avaliação do PGPMS, as amostras foram preparadas a partir da dissolução do polímero em tetraidrofurano a 0,5 % (v/v). Esta medida foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

3.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

O polímero PGPMS e as fases Si(PGPMS) foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier para avaliar a imobilização do polímero sobre a sílica, através da identificação de grupos funcionais característicos do PGPMS na fase estacionária. Cerca de 5 mg do polímero ou da fase Si(PGPMS) foram empregados na preparação de pastilha, na proporção 1:100 (m/m), de KBr sólido. A mistura foi prensada em um porta-amostra apropriado e este foi levado a um espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100. As medidas foram realizadas na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e uma taxa de 32 varreduras por minuto. Esta medida foi realizada no Laboratório de Instrumentação do Curso de Química da FACIP/UFU.

3.4.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si

As fases Si(PGPMS) foram analisadas por ^{29}Si NMR com polarização cruzada com rotação em um ângulo mágico (CP-MAS) no núcleo de silício. Os espectros foram obtidos para avaliar o tipo de interação do polímero PGPMS com o suporte cromatográfico, avaliando-se, desta forma, a possível presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica após a etapa de imobilização térmica do polímero. Esta medida foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

3.4.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a caracterização morfológica das fases Si(PGPMS) produzidas neste trabalho. Na SEM as partículas foram fixadas em porta-amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. Esses suportes foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JMS 6360-LV com microsonda de raios-X. As partículas de fase estacionária Si(PGPMS) foram amplificadas entre 500 e 10000 vezes, a fim de observar as suas características morfológicas. Essas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU.

3.4.7 Análise de área superficial e porosidade

As amostras 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 (Brummet, Elmer e Teller) (GREGG; SING, 1982) a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 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_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 1. Esta medida foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

$$dp = \frac{4 V_p}{S_{BET}} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: d_p = diâmetro de poros; V_p = volume de poros e S_{BET} = área superficial específica obtida pelo método BET.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

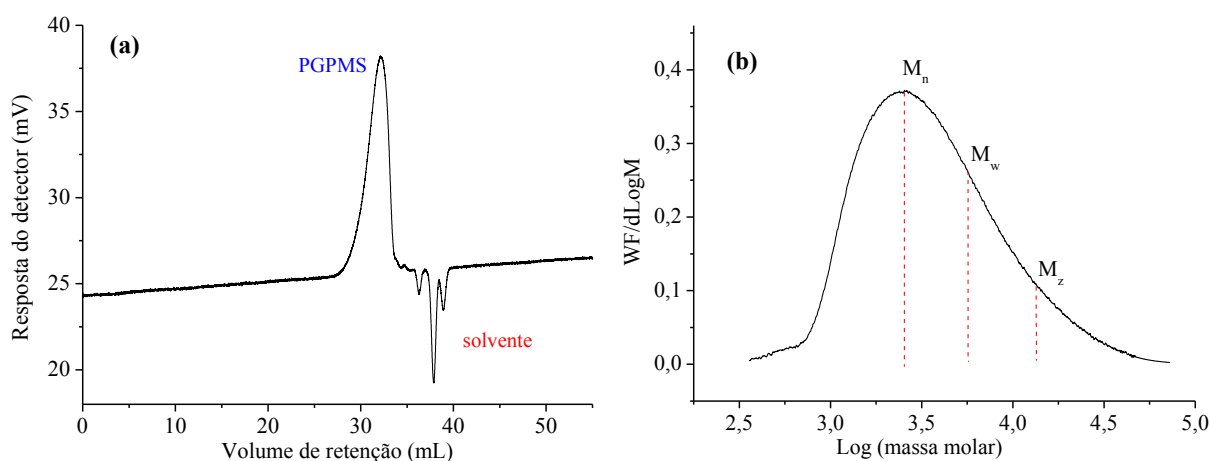
4.1 Caracterização físico-química do PGPMS

As informações sobre copolímero foram determinadas experimentalmente em virtude da falta de informações pelo fabricante comercial e também pela escassez de informações na literatura. Inicialmente, foi realizado um teste de solubilidade do copolímero para que soluções do mesmo fossem preparadas no trabalho. Cerca de 2 mL do PGPMS foram adicionados em tubos de ensaio contendo hexano, isopropanol e clorofórmio. O que melhor solubilizou o copolímero foi o clorofórmio. As propriedades físico-químicas do PGPMS e sua potencialidade de aplicação como fase cromatografia líquida de alta eficiência- fase reversa (RP-LC) foram avaliadas através da análise de diferentes porções do copolímero por TGA, FTIR e GPC.

4.1.1 Cromatografia de permeação em gel

A GPC foi utilizada para caracterizar as propriedades do PGPMS quanto ao índice de polidispersividade (IP) e sua massa molar média. Essas informações são importantes para avaliar a taxa de transferência de massa na camada polimérica da fase estacionária. A Figura 6 apresenta a distribuição de massa molar do PGPMS obtida por GPC.

Figura 6. (a) Perfil cromatográfico de GPC e (b) distribuição de massas molares para o PGPMS.



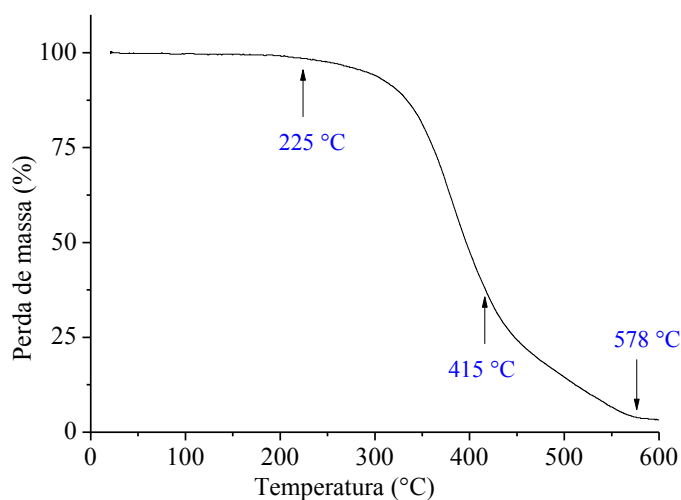
A massa molar numérica média de 2686 g mol^{-1} e a massa molar ponderal média de 5850 g mol^{-1} para o PGPMS foram obtidas a partir de uma curva analítica, que relacionou a massa molar de padrões de poliestireno pelos seus respectivos volumes de retenção obtidos pela análise

por GPC, substituindo o volume de retenção do PGPMS obtido no cromatograma da Figura 6a na equação da reta obtida da curva analítica a partir de sua regressão linear. O PGPMS apresentou uma ampla distribuição de massas molares, uma vez que o índice de polidispersividade foi de 2,178, valor maior se comparado a outros polímeros empregados no preparo de fases estacionárias que normalmente apresenta valores menores que 1,200. Os resultados de GPC indicaram ainda que o PGPMS possui aproximadamente 20 unidades monoméricas (considerando sua massa molar ponderal média e a massa molar de um monômero de PGPMS). Esse comprimento relativamente curto de cadeia lateral sugere a produção de camadas finas de filme polimérico sobre o suporte cromatográfico, o que resulta em rápidas taxas de transferência de massa.

4.1.2 Análise termogravimétrica

A TG foi empregada para caracterizar os eventos térmicos que ocorrem com o copolímero PGPMS e avaliar seu uso na imobilização térmica sobre partículas de sílica. A Figura 7 apresenta a curva TG obtida para o PGPMS.

Figura 7. Curva TG em atmosfera oxidante para o PGPMS.



O copolímero apresentou três eventos térmicos de acordo com a curva TG da Figura 7. O primeiro evento corresponde a um platô, da temperatura ambiente até 225 °C, na qual o PGPMS apresentou estabilidade térmica, sendo adequado para ser imobilizado termicamente sobre a sílica até a temperatura de 200 °C. Entre 225 °C e 415 °C, ocorre o segundo evento térmico, correspondendo a uma perda de massa de cerca de 60 % da massa inicial que está associada a mineralização do glicidoxipropilmetilsiloxano. A partir de 415 °C até 578 °C ocorre o terceiro

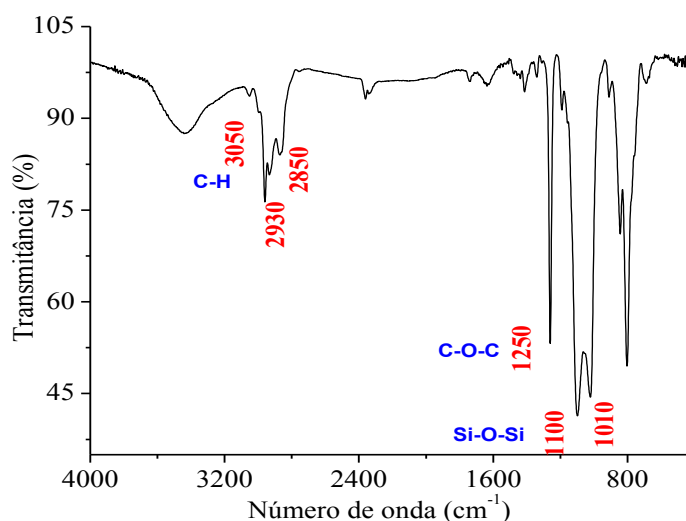
evento térmico do copolímero, sendo este intervalo associado à perda de massa do bloco de dimetilsiloxano do copolímero, restando ao final cerca de 3 % de cinzas.

O perfil térmico do PGPMS é interessante, pois permite separações em temperaturas elevadas, o que melhora o desempenho da separação com redução da pressão do sistema devido à diminuição da viscosidade dos eluentes da fase móvel.

4.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

O PGPMS foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho para identificação de seus grupos funcionais e a possibilidade de imobilização na superfície da sílica e atuação no modo RP-LC de separação. Na Figura 8 encontra-se o espectro FTIR do copolímero PGPMS.

Figura 8. Espectro de absorção do PGPMS na região do infravermelho.



Pode-se observar no espectro FTIR do copolímero PGPMS na Figura 8 um estiramento C-H de grupos epóxi em 3050 cm^{-1} , além dos sinais de ligação éter C-O-C em 1010 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , o que conferem o grau hidrofílico ao polímero. Além desses sinais, a presença do sinal característico da vibração O-H de moléculas de água em 3450 cm^{-1} é importante, pois indica a presença de água adsorvida no PGPMS que favorece o mecanismo de interação hidrofílica para compostos polares. A característica de polissiloxano do PGPMS é confirmada pelos sinais intensos relacionados ao estiramento Si-O-Si registrado em 1100 cm^{-1} e em 800 cm^{-1} .

4.2 Otimização do preparo das fases Si(PGPMS) imobilizadas termicamente

Uma vez que o polímero PGPMS apresentou características desejáveis para ser utilizado como recobrimento polimérico de fases estacionárias para HPLC, buscou-se otimizar as condições de imobilização do PGPMS sobre sílica cromatográfica. A preparação das fases Si(PGPMS) foi realizada a partir da otimização da imobilização térmica do PGPMS sobre partículas de sílica de 5 micrômetros de diâmetro. A quantidade do polímero imobilizada sobre a sílica foi a resposta medida nesta etapa, a partir da realização de um planejamento fatorial 2^2 , cujos fatores estudados foram o tempo (10 e 20 h) e a temperatura de imobilização (80 e 160 °C). Os resultados das porcentagens de carbono em cada fase produzida estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de carbono nas fases Si(PGPMS) preparadas sob condições diversas de temperatura e tempo de imobilização, seguindo o planejamento fatorial 2^2 .

Fase estacionária	Temperatura (°C)	Tempo de imobilização (h)	% C	N/m (pratos m ⁻¹)
Si(PGPMS) #1	80	10	14,2	9.420
Si(PGPMS) #2	120	10	13,5	9.820
Si(PGPMS) #3	160	10	9,4	4.110
Si(PGPMS) #4	80	20	11,7	9.660
Si(PGPMS) #5	120	20	13,1	8.590
Si(PGPMS) #6	160	20	9,7	8.320

A partir dos resultados da Tabela 3, foram calculados os efeitos do tempo e da temperatura na imobilização do PGPMS sobre a sílica. Os efeitos do tempo e da temperatura foram determinados pelas diferenças entre os resultados médios obtidos nos níveis mais altos ($t = 20$ h e $T = 160$ °C) e nos níveis mais baixos ($t = 10$ h e $T = 80$ °C) dos fatores para a porcentagem de carbono obtida pelas fases, Equações 2 e 3.

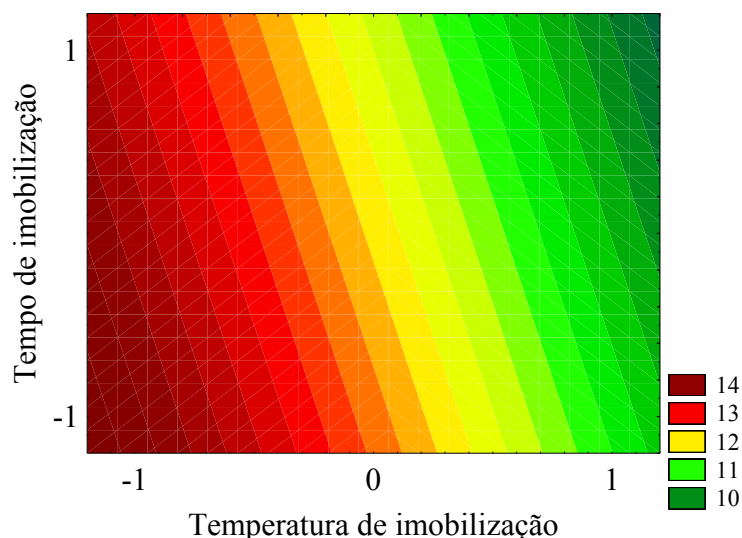
$$E_{Temperatura} = \bar{T}_+ - \bar{T}_- = \left(\frac{9,4+9,7}{2} \right) - \left(\frac{14,2+11,7}{2} \right) = 9,55 - 12,95 = -3,45 \quad \text{Eq. 2}$$

$$E_{tempo} = \bar{t}_+ - \bar{t}_- = \left(\frac{11,7+13,1+9,7}{3} \right) - \left(\frac{14,2+13,5+9,4}{3} \right) = 11,50 - 12,37 = -0,87 \quad \text{Eq. 3}$$

Conforme apresentado nas Equações 2 e 3, o efeito da temperatura na imobilização do PGPMS sobre a sílica é mais significativo ($E_T = -3,45$) que o tempo, por esse motivo foram realizados dois experimentos em temperaturas de imobilização intermediárias (experimentos #2

e #5) ao planejamento 2^2 . Construindo uma superfície de respostas para a % de carbono das fases Si(PGPMS) obtidas pelo planejamento de experimentos, pode-se assim determinar a condição ótima de imobilização do copolímero sobre a sílica. A Figura 9 apresenta a superfície de resposta para o estudo realizado.

Figura 9. Superfície de porcentagens de carbono para as fases Si(PGPMS) de acordo com os tempos e temperaturas avaliados na imobilização do PGPMS sobre sílica.



Além da porcentagem de carbono, foi avaliada também a eficiência das fases estacionárias, preparadas sob diferentes condições de imobilização, para a eluição do pico do naftaleno na mistura teste hidrofóbica. De uma forma geral, a eficiência para todas as fases Si(PGPMS) (< 10 mil pratos m^{-1}) foram menores que a de fases comerciais C_{18} , em torno de 40 mil pratos m^{-1} , o que de certa forma é esperado uma vez que a fase apresenta menor intensidade de interações intermoleculares com componentes mais hidrofóbicos como o naftaleno. Aplicando o mesmo princípio de cálculo de efeito para temperatura e tempo de imobilização, de acordo com as Equações 4 e 5, porém levando em consideração a eficiência da coluna (N/m) para as fases estacionárias, tem-se que:

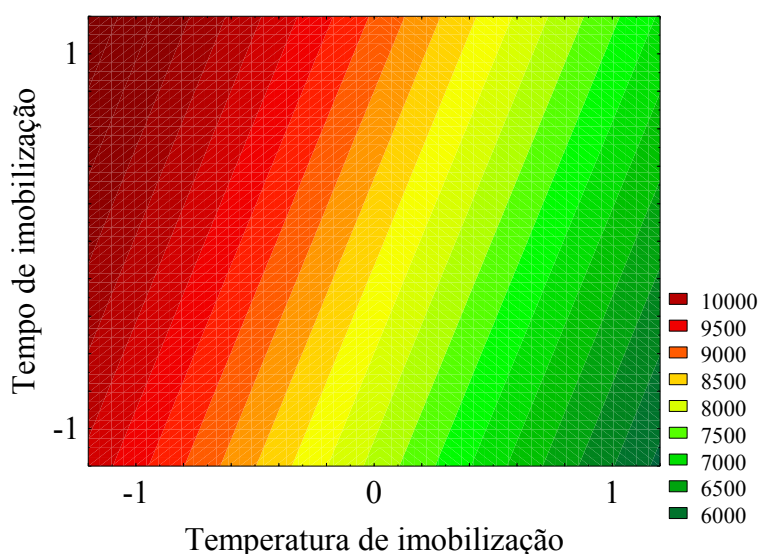
$$E_{Temperatura} = \overline{T_+} - \overline{T_-} = \left(\frac{4110+8320}{2} \right) - \left(\frac{9420+9660}{2} \right) = 6215 - 9540 = -3325 \quad \text{Eq. 4}$$

$$E_{tempo} = \overline{t_+} - \overline{t_-} = \left(\frac{8320+8590+9660}{3} \right) - \left(\frac{9420+9820+4110}{3} \right) = 8567 - 7783 = +784 \quad \text{Eq. 5}$$

De acordo com o cálculo de efeito, os resultados de eficiência de coluna acompanham os de porcentagem de carbono, ou seja, o fator que possui maior influência na resposta é a

temperatura de imobilização, tanto para melhor recobrimento do suporte cromatográfico como para o desempenho da coluna em separações. Este resultado indica que existe uma correlação entre a quantidade de PGPMS imobilizada e o desempenho cromatográfico da separação pelas fases Si(PGPMS). A Figura 10 apresenta o gráfico de curvas de nível para a eficiência de coluna de acordo com o experimento realizado para determinação das melhores condições de tempo e temperatura de imobilização.

Figura 10. Superfície de eficiências de colunas (N/m) para as fases Si(PGPMS) de acordo com os tempos e temperaturas avaliados na imobilização do PGPMS sobre sílica.



De acordo com a Figura 9 em combinação com a Figura 10, visualmente pode ser observado que as maiores porcentagens de carbono e, conseqüentemente, as maiores porcentagens de PGPMS imobilizadas sobre a sílica se encontram quando a temperatura e o tempo de imobilização correspondem à 90 °C e 12 h, respectivamente. Portanto, essas condições foram definidas como as mais apropriadas para imobilizar maiores quantidades de PGPMS sobre partículas de sílica, resultando em maior recobrimento polimérico da superfície do suporte cromatográfico.

Analisando o gráfico da superfície de eficiências de coluna (N/m) para as fases Si(PGPMS) observa-se que em temperaturas de imobilização mais baixas obtém-se as maiores eficiências de colunas, enquanto que o tempo de imobilização não apresenta uma influência significativa na resposta. Logo, considerou-se a fase Si(PGPMS) preparada sob condições ótimas de imobilização quando foram empregados temperatura e tempo de imobilização correspondentes à 90 °C e 12 h, respectivamente.

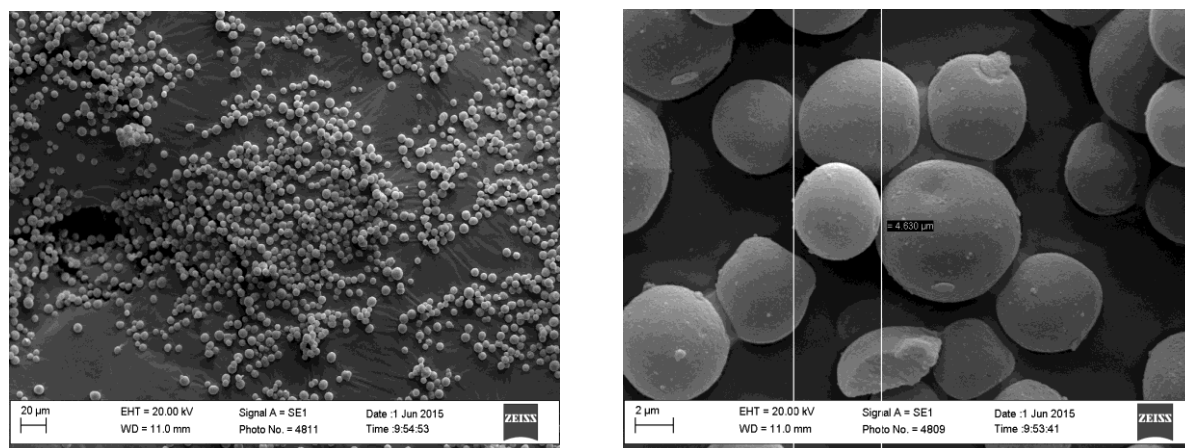
4.3 Caracterização morfológica e estrutural da fase Si(PGPMS)

As propriedades morfológicas e estruturais das fases Si(PGPMS) foram avaliadas pelas técnicas SEM, ASAP, FTIR e ^{29}Si NMR.

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

As fases estacionárias Si(PGPMS) foram caracterizadas quanto sua morfologia por SEM. A microscopia é uma importante ferramenta na caracterização de fases estacionárias para cromatografia líquida, pois o enchimento das colunas é fundamental para que a mesma apresente alta eficiência e boa resolução, que são alcançadas com partículas regulares, uniformes e livres de aglomerações. As imagens das partículas Si(PGPMS) podem ser observadas na Figura 11.

Figura 11. Imagens de SEM das partículas de Si(PGPMS) com ampliação de 700 vezes (a) e 10.000 vezes (b).



De acordo com as micrografias apresentadas na Figura 11, pode-se observar que o procedimento de imobilização polimérica não afetou a estrutura morfológica esférica do suporte de sílica de maneira significativa, apresentando boa regularidade. Isto é, a camada polimérica de PGPMS depositada sobre as partículas de sílica não alterou o seu formato esférico e não formou aglomerado de partículas, que poderia afetar negativamente o recheio das colunas cromatográficas com a fase Si(PGPMS). Quanto mais uniforme a distribuição do tamanho de partículas do material de recheio e mais regular o seu formato melhor será a compactação no enchimento da coluna cromatográfica e, conseqüentemente, maior será a eficiência de separação.

4.3.2 Área superficial e porosidade da fase Si(PGPMS)

A caracterização morfológica das fases Si(PGPMS) foi obtida também por meio de informações sobre as características de poros e de área superficial das partículas, antes e após o processo de imobilização polimérica. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Área superficial e propriedades de poros das partículas de Si(PGPMS).

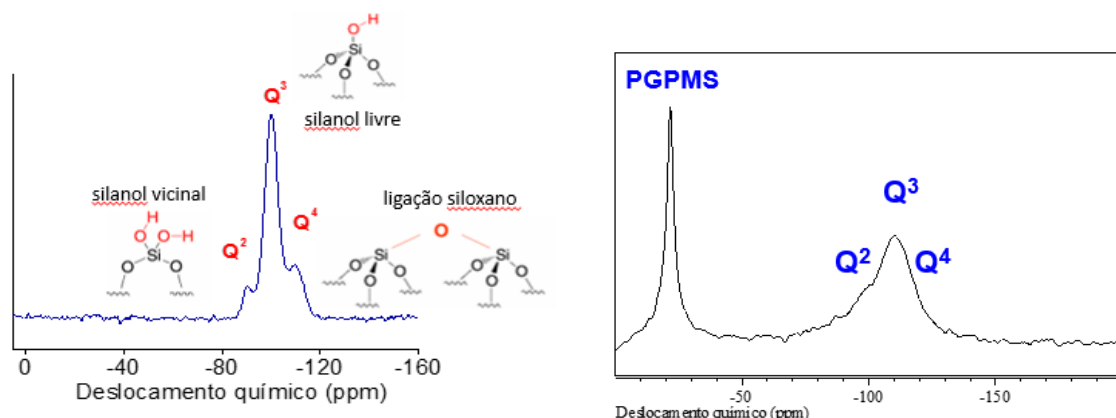
Materiais	Área superficial (m² g⁻¹)	Volume de poros (cm³ g⁻¹)	Diâmetro de poros (nm)
SiO₂	546,2	1,67	12,25
Si(PGPMS)	315,3	0,44	5,60

De acordo com os resultados da Tabela 4, pode-se observar que a imobilização do PGPMS ocorreu na superfície e nos poros da sílica cromatográfica, uma vez que ocorre uma redução da área superficial e do volume de diâmetro de poros se comparadas à sílica pura. Estes resultados são esperados já que a imobilização polimérica normalmente ocorre nos sítios ativos da sílica e estes se encontram distribuídos ao longo da superfície e também internamente nos poros do suporte de sílica. É importante observar também que a imobilização do PGPMS não bloqueou os poros da sílica, mantendo as características de alta área superficial de um material altamente poroso.

4.3.3 Ressonância magnética nuclear de ²⁹Si da fase Si(PGPMS)

Para avaliar a forma de ligação do PGPMS na sílica, foi realizada uma análise das partículas de Si(PGPMS) por ²⁹Si NMR. A ²⁹Si NMR permite avaliar a forma de interação do polímero PGPMS com os grupos ativos da superfície da sílica. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 12.

Figura 12. Espectros NMR de ^{29}Si da (a) sílica e da (b) fase Si(PGPMS).

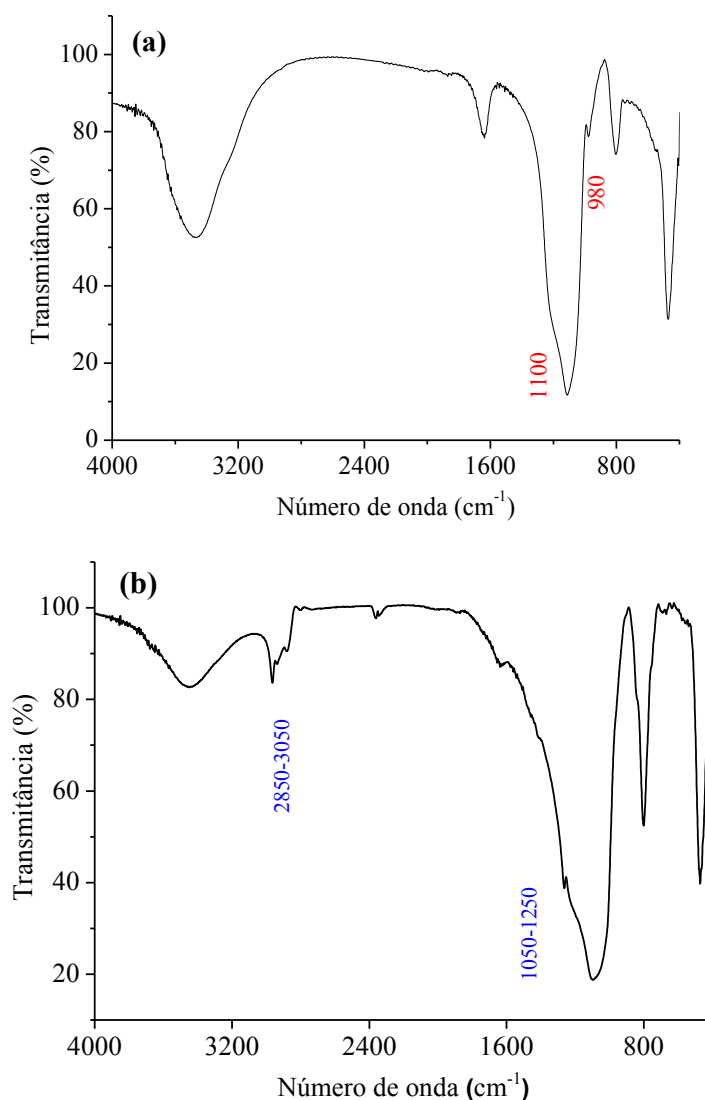


De acordo com a Figura 12 sinais característicos de deslocamento químico para grupos silanóis vicinais e silanóis livres e ligações siloxano na sílica foram obtidos em -90, -101 e -110 ppm, respectivamente (BACHMANN *et al.*, 2001). Foi observado que, em comparação com o NMR da sílica pura (Figura 12a), o sinal Q³ referente ao grupo Si-OH da fase Si(PGPMS) (Figura 12b) foi reduzido significativamente. Isto porque a razão Q³/Q⁴ é bem menor para a sílica modificada com PGPMS do que para a sílica. Um sinal no deslocamento de -20 ppm surge com alta intensidade, e se refere ao PGPMS. Esse resultado indica a formação de uma ligação entre os grupos Si-OH e o PGPMS na superfície da sílica, evidenciando a promoção de ligações químicas entre o polímero e o suporte nas fases Si(PGPMS). A ligação química do polímero na sílica garante maior resistência da fase à passagem contínua de fase móvel sob alta pressão no sistema cromatográfico.

4.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier da fase Si(PGPMS)

A estrutura química das fases Si(PGPMS) foi analisada por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier a partir da caracterização dos principais grupos funcionais presentes no material. O espectro de absorção no infravermelho da fase Si(PGPMS) está apresentado na Figura 13.

Figura 13. Espectro de absorção no infravermelho (a) da sílica nua e (b) de uma fase Si(PGPMS) imobilizada termicamente.



Através dos espectros FTIR apresentados na Figura 13 foi possível identificar a presença de alguns grupos funcionais característicos do PGPMS na fase estacionária, bem como a modificação da superfície da sílica. O sinal referente à vibração de grupos -OH na superfície da sílica em 980 cm^{-1} (Figura 13a) não é observado no espectro da fase estacionária Si(PGPMS) na Figura 13b. Este é um indicativo de que o polímero se ligou à superfície da sílica por meio dos seus grupos Si-OH. Nos espectros FTIR da fase Si(PGPMS) foi observada ainda a presença do sinal em 1250 cm^{-1} do PGPMS sobreposto ao sinal de Si-O-Si em 1100 cm^{-1} da sílica, devido ao alargamento da banda nesta região. Além disso, a presença do sinal em 3050 cm^{-1} na fase Si(PGPMS) referente ao estriamento C-H do grupo epóxi do PGPMS.

4.4 Avaliação cromatográfica das fases Si(PGPMS)

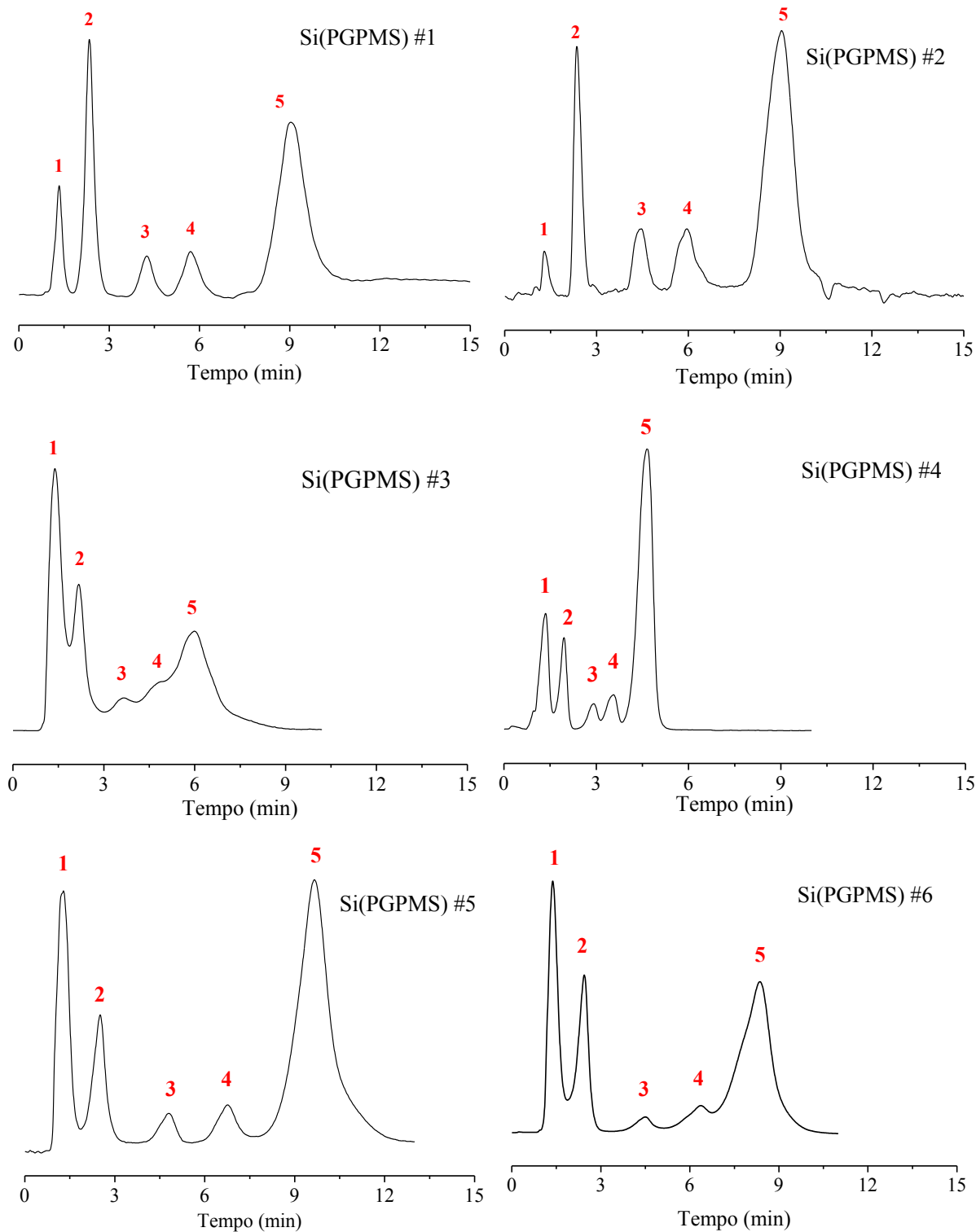
As fases estacionárias reversas preparadas a partir da imobilização do PGPMS sobre partículas de sílica cromatográfica, preparadas conforme a Tabela 1, foram caracterizadas através da análise de uma mistura padrão constituída de compostos hidrofóbicos e por meio de um protocolo de avaliação das propriedades de retenção da fase Si(PGPMS) - Mistura teste de Tanaka (KIMATA *et al.*, 1989). Este último se trata de um protocolo bem estabelecido para aferir a qualidade das fases estacionárias quanto às suas propriedades de retenção na separação de diferentes tipos de substâncias químicas.

4.4.1 Mistura hidrofóbica

Inicialmente, as fases foram aplicadas na separação de uma mistura padrão (mistura hidrofóbica) para análise das características da fase Si(PGPMS) quanto ao seu mecanismo de separação. Uma vez que a mistura hidrofóbica é constituída de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno espera-se que, em uma fase estacionária que atua tipicamente na modalidade de fase reversa, a ordem de eluição seja do composto menos hidrofóbico para o mais hidrofóbico (mais retido) dessa mistura. Foram testadas diferentes proporções de fase móvel, sendo a FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v) a composição que se mostrou mais adequada para separação dos compostos na maioria das fases Si(PGPMS) preparadas. A separação da mistura hidrofóbica, nesta condição de fase móvel, para todas as fases Si(PGPMS) preparadas neste trabalho está apresentada na Figura 14.

A separação dos compostos da mistura hidrofóbica pela fase Si(PGPMS) foi eficiente, pois os cromatogramas apresentaram picos referentes a todos os compostos, no entanto, sob condições de FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), algumas fases não conseguiram resolver totalmente a mistura de compostos, como observado na Figura 14.

Figura 14. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtidos pelas fases Si(PGPMS). Fase #1 a Fase #6. Condições cromatográficas: MeOH:H₂O (60:40, v/v); Vazão 0,4 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm.

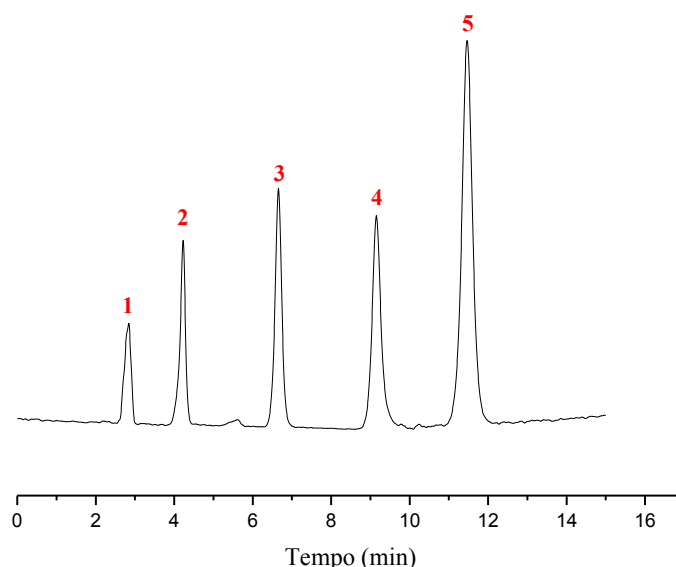


Fonte: Própria autora.

Os compostos presentes na mistura avaliada medem algumas propriedades da fase estacionária importantes para definir o grau de seletividade da mesma. Por exemplo, a uracila (1)

empregada na mistura hidrofóbica e nas demais misturas avaliadas nesse trabalho é utilizada como marcador do tempo da fase móvel, uma vez que ela interage menos com a fase estacionária, que o demais compostos. A presença do benzeno (3) e do tolueno (4) dá uma indicação da seletividade da fase, a capacidade da mesma em separar substâncias que diferem apenas por um grupo CH_3 . A presença do par benzeno (3) e naftaleno (5) fornece informações a respeito da capacidade da fase estacionária em separar substâncias que se diferem por pelo menos um anel aromático e a benzonitrila é o composto mais polar da mistura, e sua eluição no início do cromatograma indica o mecanismo de interação hidrofóbica da fase estacionária. De uma forma geral, o tempo total de análise em todas as fases Si(PGPMS) foi relativamente curto se comparado a uma fase comercial C_{18} (Figura 15), que necessitou de uma fase móvel com 80 % de metanol para que a eluição tivesse um tempo total similar à fase Si(PGPMS) #5, que levou um maior tempo para separar a mistura com 60 % de metanol na FM. Este é um indicativo de que a hidrofobicidade das fases Si(PGPMS) é menor que a fase C_{18} atendendo ao objetivo da preparação. É possível observar pelos cromatogramas, através da ordem de eluição dos compostos, que ambas as fases estacionárias possuem característica de fase reversa, uma vez que os compostos mais hidrofóbicos ficaram mais tempo retidos na coluna cromatográfica.

Figura 15. Cromatograma da separação dos compostos da mistura teste hidrofóbica pela fase C_{18} comercial. Fase móvel $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20, v/v); vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno.



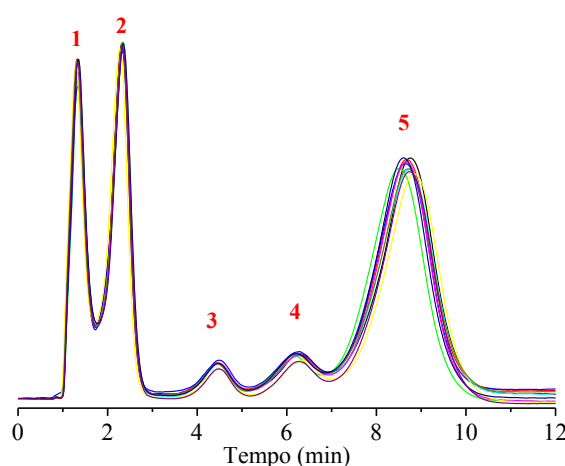
As fases imobilizadas a uma temperatura de 160°C (Figura 14) não separaram de forma eficiente todos os compostos da mistura teste padrão apresentando picos alargados. A ineficiência da separação nesta condição pode estar associada à alta temperatura aplicada para imobilizar o

PGPMS sobre partículas de sílica, que não foi capaz de produzir uma camada polimérica de PGPMS sobre a sílica, provavelmente devido a perdas por degradação térmica do polímero. Apesar da curva TG para o polímero apresentar início de degradação apenas a partir de 225 °C (Figura 7, pág. 30), na presença da sílica que apresenta moléculas de água adsorvidas e sob o aquecimento do tratamento térmico podem ter havido ruptura do anel glicidil e perdas de material polimérico, levando a menores taxas de carbono nas fases Si(PGPMS) sob temperaturas mais elevadas. Como foi observado nas análises elementares das fases Si(PGPMS), as fases imobilizadas a 160 °C resultaram em menor porcentagem de carbono e menor número de pratos (N/m).

4.4.2 Estabilidade da camada polimérica de PGPMS imobilizada sobre a sílica

Para avaliar a estabilidade da camada polimérica de PGPMS sobre a sílica na fase Si(PGPMS) com a passagem contínua da fase móvel, a mistura hidrofóbica foi injetada sequencialmente na coluna recheada com a fase Si(PGPMS) #5 e a variação dos parâmetros de retenção dos compostos foi medida. Foram realizadas 10 injeções da mistura hidrofóbica no sistema cromatográfico e a separação obtida por uma fase móvel MeOH:H₂O (60:40, v/v). Os cromatogramas obtidos estão sobrepostos na Figura 16.

Figura 16. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtidos pela fase Si(PGPMS) #5 após medidas consecutivas. Condições cromatográficas: MeOH:H₂O (60:40, v/v); Vazão 0,4 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm.



Fonte: própria autora

Como se observa na Figura 16, as sucessivas injeções da mistura hidrofóbica na fase Si(PGPMS) resultou na constância dos parâmetros de retenção de uma medida para outra,

mostrando que não há perda de PGPMs arrastado da superfície da sílica pela fase móvel. A pequena diferença entre os tempos de retenção dos picos se deve à injeção manual da mistura no equipamento. Assim, observa-se que o material apresenta potencialidade na separação de substâncias uma vez que a identificação dos picos pode ser realizada pela comparação com os tempos de retenção de padrões analisados sob mesmas condições, já que os parâmetros de retenção não sofrem variação com a passagem de fase móvel.

4.4.3 Mistura teste de Tanaka

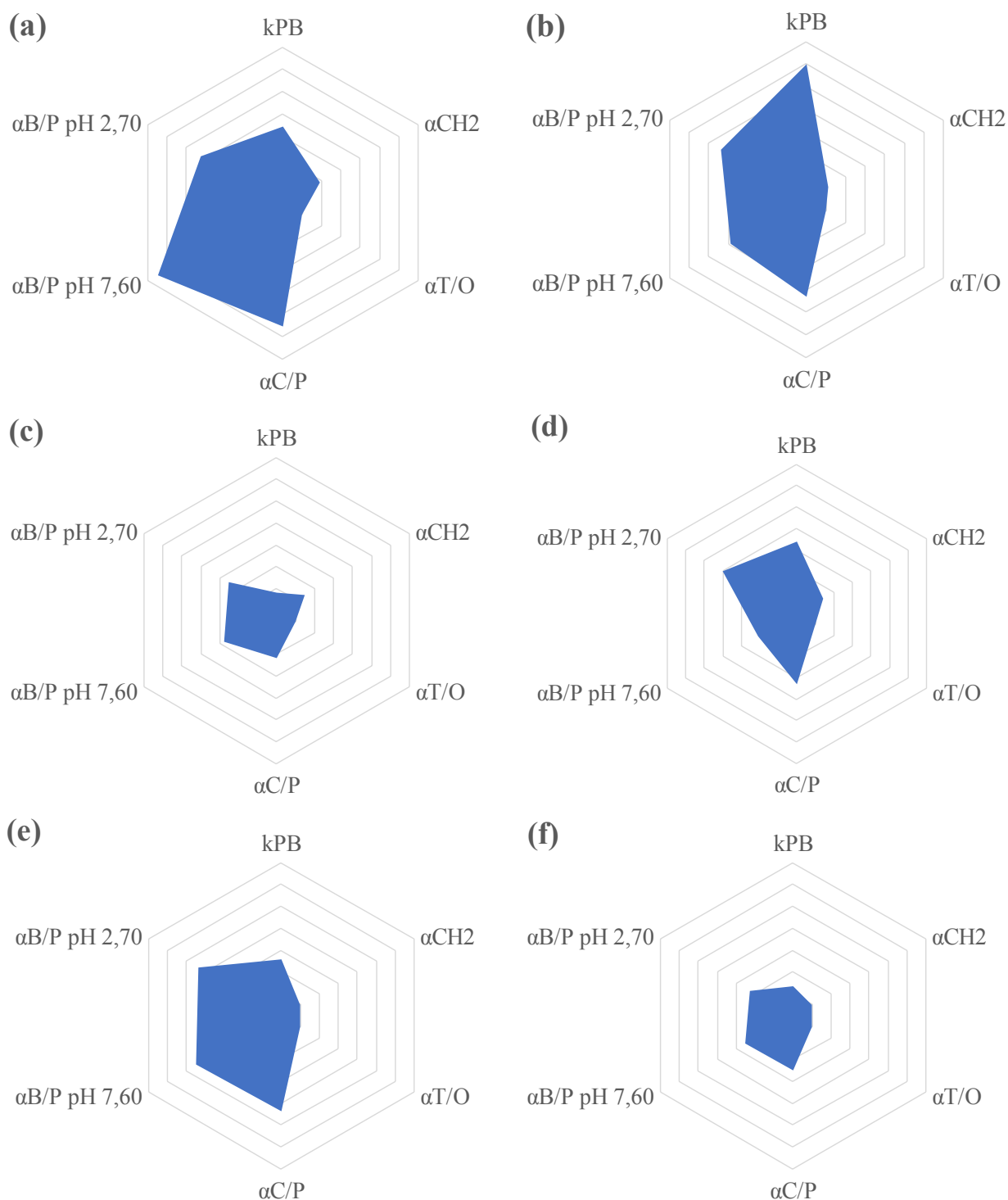
Para determinar as propriedades de retenção das fases Si(PGPMs) preparadas sob diferentes condições, foi realizado um estudo de caracterização cromatográfica a partir da separação de misturas testes propostas por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989). Os parâmetros cromatográficos das FE medidos pelas misturas de Tanaka são: hidrofobicidade (k_{PB}), seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) e seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$); a capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$); a capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P}$ pH 7,60) e a acidez ($\alpha_{B/P}$ pH 2,70) da fase estacionária. A Tabela 5 mostra as propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(PGPMs).

Tabela 5. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(PGPMs).

Parâmetros	Fases Si(PGPMs)					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
k_{PB}	3,44	5,99	0,83	3,36	2,56	1,35
α_{CH_2}	1,89	1,09	1,46	1,39	1,00	1,00
$\alpha_{T/O}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{C/P}$	5,53	4,31	2,18	3,27	4,38	2,49
$\alpha_{B/P}$ pH 7,60	6,48	3,91	2,80	2,12	4,49	2,55
$\alpha_{B/P}$ pH 2,70	4,23	4,38	2,55	4,03	4,38	2,29

Para melhor avaliação dos resultados de retenção nas fases Si(PGPMs), os dados da Tabela 5 foram apresentados também na forma de gráficos do tipo radar, Figura 17.

Figura 17. Gráfico radial das propriedades de retenção, de acordo com o protocolo de Tanaka, das fases Si(PGPMS) preparadas sob diferentes condições de imobilização. (a) Fase #1 até (f) Fase #6.



Para análise da Figura 17, a área sombreada em cada gráfico representa o grau de interação dos compostos nas quatro misturas de Tanaka, logo, quanto maior a área sombreada melhor a tendência da fase separar misturas de compostos de características distintas. De uma forma geral, observa-se que as fases Si(PGPMS) #3 e #6 foram as que apresentaram menor área sombreada, indicando as fases com menor desempenho na separação cromatográfica. Esse resultado

corroborar com os obtidos para a porcentagem de carbono e eficiência de coluna apresentados anteriormente, em que temperaturas de imobilização de 160 °C não são adequadas para o preparo das fases Si(PGPMS). Assim, na discussão dos parâmetros de retenção, essas fases não serão consideradas.

Com relação às propriedades de retenção avaliadas, a primeira foi a hidrofobicidade das fases Si(PGPMS) medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno (k_{PB}) na mistura I de Tanaka. De acordo com a Tabela 5 e Figura 17, a hidrofobicidade das fases Si(PGPMS) sofre uma variação não uniforme com as condições de imobilização. Os valores obtidos de k_{PB} ficaram na faixa de 0,83 a 5,99, sendo os menores valores para as fases #3 e #6. Estes valores indicam uma hidrofobicidade para as fases Si(PGPMS) comparável com os valores obtidos para diversas fases comerciais, em que o k_{PB} é normalmente superior a 4,0 (EUEBY; PETERSSON, 2003), indicando retenção hidrofóbica dos compostos nas fases Si(PGPMS). Com relação à seletividade metilênica (α_{CH_2}), que é a capacidade da fase em separar duas substâncias que se diferem apenas por um grupo metilênico, as fases imobilizadas a 80 °C (#1 e #4) apresentaram valores similares a fases reversas comerciais (Cruz *et al.*, 1997), enquanto que as demais não tiveram essa capacidade. Ainda pela mistura I, foi medida a seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$) das fases Si(PGPMS) e, como pode ser visto pela Tabela 5, nenhuma das fases preparadas apresentou capacidade de separar compostos que se diferenciam pela disposição espacial de sua molécula.

A partir da mistura teste II de Tanaka, a capacidade de formação de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$) das fases Si(PGPMS) foi determinada. Todas as fases apresentaram valores elevados de $\alpha_{C/P}$, quando comparados com as fases disponíveis comercialmente (Cruz *et al.*, 1997). Este resultado pode ser um indicativo de que a ruptura do anel glicidil do PGPMS pode ter ocorrido durante a etapa de imobilização e, com o anel aberto, ligações de hidrogênio entre o PGPMS e os compostos tornaram-se mais efetivas.

A capacidade de troca iônica ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$) das fases Si(PGPMS) foi determinada através da análise da Mistura teste III de Tanaka, empregando fase móvel tamponada em pH 7,60. Nesta condição quase a totalidade dos grupos silanóis residuais estão desprotonados, portanto, devem interagir fortemente com a benzilamina, que estará parcialmente protonada, através do mecanismo de troca iônica, ficando retida fortemente na coluna cromatográfica. Os valores de $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$ obtidos para as fases Si(PGPMS) foram bem superiores aos obtidos por fases comerciais, indicando que a fase apresenta retenção mais forte para compostos com características polares/básicas, provavelmente devido ao grupamento glicidil da estrutura polimérica. De certa forma, esse resultado era pretendido, uma vez que a preparação da fase

Si(PGPMS) tinha como objetivo principal produzir um material de separação capaz de interagir mais fortemente com compostos que são difíceis de serem analisados por RP-LC.

A acidez da fase Si(PGPMS) foi medida pelo parâmetro $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7}$ a partir da separação da benzilamina e do fenol da Mistura IV de Tanaka, empregando fase móvel tamponada em pH 2,70. Nesta condição, a benzilamina e os grupos residuais do suporte se encontram totalmente protonados. Portanto, para haver interação entre a benzilamina e os grupos residuais do suporte não recoberta pela camada de PGPMS, a superfície do suporte deveria ser suficientemente ácida, para que ainda haja silanóis desprotonados em pH 2,70. Logo, o $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$ é um indicativo da acidez superficial da fase, quanto maior o seu valor maior é a retenção da benzilamina, logo mais ácida é a superfície da fase. Os valores de $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$ obtidos para as fases Si(PGPMS) imobilizadas a 80°C e 120 °C apresentaram resultados similares, em torno de 4,0, sendo muito superiores a de fases comerciais (Cruz *et al.*, 1997). Além da acidez superficial do suporte de sílica que não recoberto pela camada polimérica, a contribuição do anel glicidil aberto pode ter importância significativa para os valores obtidos. Isto porque fases estacionárias imobilizadas por polímeros normalmente apresentam valores de $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$ menores que de fases comerciais, devido ao melhor recobrimento do suporte cromatográfico (DIB; FARIA, 2014; CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016). Novamente, este valor mais elevado pode significar interações mais fortes da fase Si(PGPMS) com compostos que normalmente não são retidos em fases comerciais (alguns fármacos, nucleosídeos, sulfacompostos, corantes, etc.), possibilitando separações eficientes de misturas desses compostos.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o PGPMS apresenta características físico-químicas que o torna um recobrimento polimérico em potencial para uso como fase estacionária reversa com características polares, devido à presença do grupo glicidil em sua estrutura monomérica, de alto desempenho, com rápida taxa de transferência de massa de soluto.

Com relação à otimização do preparo de fases estacionárias observou-se que, dentro da região experimental estudada, tempos e temperaturas de imobilização mais baixos produzem fases estacionárias com maiores porcentagens de PGPMS e fases estacionárias com melhor desempenho cromatográfico (maior eficiência de coluna). Assim, foram consideradas condições ótimas de imobilização tempo de 12 h e temperatura de 90 °C, que serão considerados para as etapas futuras do trabalho.

A avaliação cromatográfica das fases a partir da separação das misturas testes padrão mostra que o desempenho de separação da fase Si(PGPMS) foi eficiente, resultando em separações típicas da modalidade de RP-LC, pois os compostos mais hidrofóbicos foram os mais retidos. Os resultados alcançados com o protocolo de Tanaka indicaram que há interferência principalmente da temperatura de imobilização do polímero na superfície do suporte cromatográfico nas propriedades de retenção das fases estacionárias. De uma forma geral, compostos polares, ácidos e básicos apresentaram maior retenção nas fases Si(PGPMS), indicadas pelos maiores valores dos parâmetros de capacidade de formação de ligação de hidrogênio, capacidade de troca iônica total e acidez para as fases estacionárias Si(PGPMS). Essas características são desejáveis para o material, uma vez que espera-se maior retenção de compostos polares por mecanismo de interação hidrofóbica (fase reversa) com a fase estacionária, para garantir separações adequadas de misturas, algo que não acontece com os materiais convencionais comerciais empregados como fase estacionária reversa atualmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAZAWA, T.A.; JARDIM, I.C.S.F. Polymethyloctylsiloxane adsorbed on porous silica as a packing material for reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* v. 17, p. 1265-1279, **1994**.

BACHMANN, S.; MELO, L.F.C.; SILVA, R.B.; ANAZAWA, T.A.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Synthesis and Solid-State NMR Investigations of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silicas. *Chem. Mat.* v. 13, p. 1874-1879, **2001**.

BERTHOD, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *Journal of Chromatography*, v. 549, p. 1-28, **1991**.

BOTTOLI, C.B.G. **Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência**. Tese de Doutorado do Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.

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**.

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

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006, 452p.

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**.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, **1998**.

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

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

EUERBY, M.R.; PETERSSON, P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 994, p. 13-36, **2003**.

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**.

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. London: Academic Press, 1982, 303p.

INNOCENZI P.; FIGUS C.; KIDCHOB T.; VALENTINI M.; ALONSOD B.; TAKAHASHI M. Sol-gel reactions of 3-glycidoxypentyltrimethoxysilane in a highly basic aqueous solution. *Dalton Transactions*, p. 9146 - 9152, **2009**.

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**.

KIMATA, K.; IWAGUCHI, K.; ONISHI, S.; JINNO, K.; EKSTEEN, R.; HOSOYA, K.; ARAKI, M.; TANAKA, N. Chromatographic characterization of silica-C18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. *Journal of Chromatographic Science*, v. 27, n. 12, p. 721-728, **1989**.

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

KURGANOV, A.; TRUDINGER, U.; ISAEVA, T.; UNGER, K. Native and modified alumina, titania and zirconia in normal and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 42, p. 217-222, **1996**.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, **2010**.

MEYER, V.R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 5th ed., New York: Wiley, 2010, 426p.

NASAL, A.; HABER, R.; KALISZAN, R.; FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T.; ABRAHAM, M.H. Polyethylene-coated silica and zirconia stationary phases in view of quantitative structure-retention relationships. *Chromatographia*, v. 43, p. 484-490, **1996**.

SANTOS, A. L. R. **Preparação, otimização e caracterização de uma fase estacionária obtida pela imobilização térmica de poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) em partículas de sílica aluminizada** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Química, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia. 2016.

SILVA, C.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 27, p. 270-276, **2004**.

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**.

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.

TONHI, E; COLLINS, K.E.; JARDIM I.C.S.F., COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quimica Nova*, v. 25, p. 616-623, **2002**.

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences*, p. 1–38, **2000**.