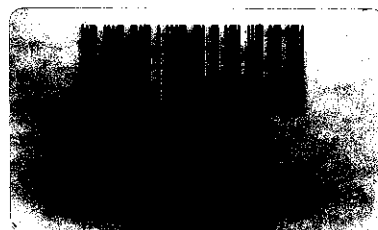


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**Desenvolvimento de um novo procedimento de
avaliação da estabilidade de fases estacionárias
para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Dania Alvarez Fonseca

Orientadora: Prof^a Dr^a Carol Hollingworth Collins



UNICAMP

Instituto de Química

Campinas
Março 2001

La perfección no esta al alcance de ningún humano, pero el esfuerzo por alcanzarla es lo que enriquece y da valor a la vida.

*A mis queridos padres (Ideliza y Basilio)
y a mi marido (Humberto), por el apoyo
diario, amor y comprensión.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ À professora Carol Hollingworth Collins, meus agradecimentos especiais pela orientação, incentivo, atenção, apoio e dedicação;
- ❖ Aos professores Kenneth Elmer Collins e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pelas sugestões e o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho;
- ❖ Às minhas amigas Zahra, Carla e Glaucia pela ajuda nas correções, troca de experiências, além da confiança e amizade;
- ❖ Aos amigos e colegas de laboratório Rosely, Lúcio, Edivan, Priscila, Sônia, Joseane, Lúcia, Marcos, Ricardo, Katia, Nilva, pela ajuda, discussões, companheirismo e convivência agradável;
- ❖ Ao Waltinho pela confecção das peças;
- ❖ À Indústria Ibras CBO pela colaboração na irradiação gama das amostras.
- ❖ Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelas imagens realizadas no microscópio eletrônico de varredura;
- ❖ À UNICAMP e ao Instituto de Química pela oportunidade;
- ❖ Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Título: "Desenvolvimento de um novo procedimento de avaliação da estabilidade de fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência"

Autora: Dania Alvarez Fonseca

Orientadora: Prof^a Dr^a Carol Hollingworth Collins

Este trabalho visa o desenvolvimento de um novo método para avaliar a estabilidade de fases estacionárias (FE) do tipo fase reversa (FR), em um menor tempo e com menor volume de solvente, comparados com os testes de estabilidade reportados na literatura. Diferentes parâmetros foram pesquisados tais como: efeito da temperatura, do pH, da vazão da fase móvel (FM) alcalina e da FM utilizada na avaliação da coluna.

O efeito da temperatura foi avaliado em FM neutra com temperaturas que variaram entre 30 e 60°C. No caso do pH utilizaram-se FM com diferentes valores de pH (8,4; 9,2 e 10,1), mantendo-se, em todos os casos, temperaturas de 60°C. As vazões de FM alcalina utilizadas foram de 0,6 mL min⁻¹ e 1,2 mL min⁻¹. As avaliações da coluna foram feitas em FM neutra e alcalina. Os testes iniciais foram feitos com a sílica Davisil, onde a fase líquida de poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) encontra-se sorvida nos poros do suporte de sílica, sem ligações covalentes com os grupos ativos da superfície. Estas fases podem ser estudadas nas condições de pH 8,4, temperaturas de 60°C e vazões da FM alcalina de 0,6 mL min⁻¹, realizando as avaliações na mesma FM alcalina, com pouco gasto de solvente.

Outras colunas preparadas com FE baseadas em sílica modificada com zircônia, mais resistentes em valores extremos de pH, foram avaliadas em condições mais agressivas, em pH 10 e a 60°C. Nas mesmas condições foram testadas duas colunas comerciais cujos estudos de estabilidade estão estabelecidos na literatura, a fim de poder determinar nestas condições qual volume de FM alcalina pode passar por uma coluna considerada de boa estabilidade, sem que haja mudanças apreciáveis no comportamento cromatográfico.

As fases estacionárias, antes e depois da degradação, foram caracterizadas por Análise Elementar de Carbono e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O novo procedimento permite estudar a estabilidade de colunas de fase reversa de forma mais rápida (são requeridos no máximo dois dias em vez de 6 meses) e com menor volume de solvente (menos de 1 % do utilizado nos testes reportados na literatura).

ABSTRACT

Title: "Development of a New Stability Testing Procedure for Stationary Phases Used in High Performance Liquid Chromatography"

Author: Dania Alvarez Fonseca

Supervisor: Dr. Carol Hollingworth Collins

In this work we developed a new procedure for the testing of reversed phase (RP) stationary phase stability, taking less time and using less solvent, as compared to tests reported in the literature. The effects of temperature, pH and alkaline mobile phase flow-rate were studied.

The temperature effect in neutral mobile phases was studied for temperatures between 30 and 60°C. pH values of 8,4, 9,2 and 10,1 were used to study the pH effect, with the temperature held at 60 °C. Alkaline mobile phase flow rates of 0.6 mL min⁻¹ and 1.2 mL min⁻¹ were used.

The initial tests were made using Davisil silica, with the liquid phase poli(methyocylsiloxane) (PMOS) sorbed into the pores of the silica support, without covalent bonding with the active groups of the silica surface. The above phase can be studied by using pH 8.4, 60°C and a flow-rate of 0.6 mL min⁻¹. Under these conditions a low solvent quantity is required. Other columns, prepared with zirconized silica, more resistant to high pH values, were tested under more aggressive conditions (pH 10 and 60°C). Under these conditions, commercial columns for which stability studies are reported in the literature were also tested. This study was carried out in order to determine, under these conditions, which volume of alkaline mobile phase can pass through a column considered of high stability without notable changes in the chromatographic behavior.

The stationary phases, before and after degradation, were characterized by Carbon Elemental Analysis and Scanning Electron Microscopy (SEM).

With the new testing procedure the column stability of reversed phases can be studied in two days instead 6 months. The solvent expense is significantly lower, less than 1 % of that for the solvent used in traditional tests.

CURRICULUM VITAE

Dania Alvarez Fonseca

Data e local de nascimento: 20 de março de 1970, La Habana, Cuba

1. Formação Acadêmica:

- Mestrado em Química Analítica, Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LABCROM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, de março de 1999 a março de 2001.
- Bacharelado em Química, Universidad de la Habana, Cuba, de setembro de 1988 a setembro de 1993.

2. Cursos:

- Cromatografia Gaseosa y Cromatografia Líquida, de dezembro de 1994 a julho de 1995. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba.

3. Trabalhos apresentados em congressos:

- "Determinación del contenido de ingrediente activo de lambda cihalotrina y cipermetrina en caldos de aspersión"., Fonseca, D.A., Portuondo, A.B., XII Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1997, La Habana, Cuba.
- "Evaluación de formulaciones de propanil con diferentes solventes"., Portuondo, A.B., Fonseca, D.A., III Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, em julho de 1997, La Habana, Cuba.
- "Determinación del contenido de ingrediente activo del producto 2,4-D-éster isocílico por cromatografía gaseosa"., Fonseca, D.A., Portuondo, A.B., XI Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1996, La Habana, Cuba.
- "Obtención de patrones analíticos a partir de formulados de plaguicidas"., Fonseca, D.A., Portuondo, A.B., XI Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1996, La Habana, Cuba.

- "Degradación del carbofuran en suelo a causa de su uso repetido"., Dieskmeier, G., Hernández, R., Gonzáles, K., García, M., Portuondo, A.B., Fonseca, D.A., XI Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1996, La Habana, Cuba.
- "Determinación de nicotina en caldos acuosos por cromatografía gaseosa"., Portuondo, A.B., Fonseca, D.A., X Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1995, La Habana, Cuba.
- "Procedimientos físico- químicos para la caracterización de los problemas de efectividad en los tratamientos de propanil 36 % en el cultivo del arroz"., Barquin; J.M., Portuondo, A.B., Fonseca, D.A., Batista, R., Rodríguez, I. G., X Fórum de Ciencia y Técnica, em setembro de 1995, La Habana, Cuba.

ÍNDICE GERAL

Índice de figuras	xxi
Índice de tabelas	xxv
I. Introdução	1
I.1. Princípios básicos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	4
I.2. Fases estacionárias do tipo reversas.....	4
I.2.1. Suportes cromatográficos.....	4
I.2.2. Fases líquidas.....	5
I.3. Condições de análises para compostos ionizáveis.....	6
I.4. Fases estacionárias quimicamente ligadas.....	7
I.5. Procedimentos desenvolvidos para melhorar as propriedades de fases estacionárias reversas.....	10
I.5.1. Modificações feitas em relação as fases líquida ou quimicamente ligada.....	11
I.5.1.1. Fases estacionárias monoméricas estericamente protegidas.....	11
I.5.1.2. Fases estacionárias imobilizadas.....	11
I.5.1.3. Fases estacionárias capeadas.....	12
I.5.1.4. Fases estacionárias bidentadas.....	12
I.5.1.5. Fases estacionárias polimerizadas horizontalmente.....	13
I.5.1.6. Fases estacionárias sintetizadas com hidreto intermediário.....	14
I.5.1.7. Fases estacionárias encapsuladas.....	15
I.5.1.8. Fases ligadas com grupo polar embutido.....	15
I.5.2. Modificações feitas em relação ao suporte.....	16
I.5.2.1. Substituição da sílica como suporte.....	16
I.5.2.2. Fases estacionárias baseadas em partículas híbridas.....	17
I.5.1.3. Fases estacionárias com sílica modificada.....	18
I.5.2.4. Fases estacionárias preparadas com sílica sol-gel.....	19
I.6. Fatores que aceleram a degradação da coluna.....	19
I.7. Considerações relacionadas com o tempo de vida das colunas.....	21
II. Objetivos	23

III. Parte Experimental	27
III.1. Materiais	29
III.1.1. Reagentes e solventes.....	29
III.1.2. Fase estacionária líquida e suporte.....	29
III. 1.3. Coluna cromatográfica.....	29
III.2. Equipamentos	30
III.3. Preparação da fase estacionária	31
III.3.1. Lavagem da sílica.....	31
III.3.2. Sínteses da sílica zirconizada.....	31
III. 3.3. Recobrimento do suporte.....	32
III.3.4. Imobilização do PMOS sobre a sílica zirconizada.....	32
III. 4. Enchimento das colunas	32
III 4.1. Preparo da suspensão.....	32
III.4.2. Procedimento de enchimento das colunas.....	33
III.5. Fase móvel	34
III. 6. Condicionamento das colunas	35
III.7. Avaliação das colunas	35
III.7.1.- Mistura teste.....	35
III.7.2.- Cálculo dos parâmetros cromatográficos.....	35
III. 8. Parâmetros avaliados para testes de estabilidade	38
III.8.1. Efeito da temperatura.....	38
III.8.2. Uso de condições agressivas.....	38
III.8.3. Efeito do pH.....	39
III.8.4. Efeito da vazão da fase móvel alcalina.....	40
III.8.5. Efeito da fase móvel na avaliação da coluna.....	40
III.9. Comportamento da coluna de sílica zirconizada com o pH	40
III.10. Procedimento de avaliação da estabilidade para colunas de fase reversa	41
III.10.1. Caracterização física das fases estacionárias.....	41
III.10.1.1. Análise Elementar de Carbono.....	42
III.10.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42

IV. Resultados e Discussões	45
IV.1.-Parâmetros avaliados para testes de estabilidade.....	47
IV.1.1. Efeito da temperatura.....	47
IV.1.2. Uso de condições agressivas.....	52
IV.1.3. Efeito do pH.....	54
IV.1.4. Efeito da vazão da fase móvel alcalina.....	56
IV.1.5. Efeito da fase móvel na avaliação da coluna.....	58
IV.2. Comportamento da coluna de sílica zirconizada com o pH.....	63
IV.3. Procedimento de avaliação para colunas de fase reversa.....	65
IV.3.1 Caracterização física das fases estacionárias.....	69
IV.3.1.1. Análise elementar de carbono.....	69
IV.3.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
IV.3.2.Considerações do novo método de avaliação da estabilidade.....	78
V. Conclusões	79
VI. Referências Bibliográficas	83
Anexo 1	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Tipos de silanóis na superfície da sílica gel amorfa: (1) vicinais, (2) geminais e (3) isolado.....	5
Figura 2.- Esquema do sistema de enchimento.....	33
Figura 3.- Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.....	36
Figura 4.- Cromatogramas com as medidas relacionadas à determinação da assimetria de picos.....	37
Figura 5.- Efeito da temperatura no desempenho da coluna Davisil (PMOS)-A Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H ₂ O (60:40), vazão de teste e avaliação : 1,2 mL min ⁻¹ e 0,3 mL min ⁻¹ , respectivamente. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.....	48
Figura 6.- Efeito da temperatura no desempenho da coluna Davisil (PMOS)-B. Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H ₂ O (60:40), vazão de teste e avaliação : 1,2 mL min ⁻¹ e 0,3 mL min ⁻¹ , respectivamente. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.....	49
Figura 7.- Eficiência da coluna Davisil (PMOS)- B utilizando diferentes vazões da fase móvel. Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H ₂ O (60:40), vazão de teste :1,2 mL min ⁻¹ . Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.....	51
Figura 8.- Comparação da estabilidade de algumas colunas comerciais com a coluna Davisil (PMOS)-C a pH 10,1 e 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50), vazão: 1,2 mL min ⁻¹ Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H ₂ O (70:30), vazão: 0,3 mL min ⁻¹	53
Figura 9.- Efeito do pH na estabilidade da coluna Davisil (PMOS) á temperatura de 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + NaOH com pH variado (50:50), vazão: 1,2 mL min ⁻¹ . Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H ₂ O (70:30), vazão: 0,3 mL min ⁻¹	55

Figura 10. -Efeito da vazão da fase móvel alcalina na estabilidade da coluna Davisil (PMOS)-D e F com temperatura de 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , pH 8,4 (50:50). Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H ₂ O (70:30), vazão: 0,3 mL min ⁻¹	57
Figura 11. -Avaliação da coluna Davisil (PMOS)-C e G, em fases móveis neutra (MeOH/H ₂ O (70:30), vazão: 0,3 mL min ⁻¹) e alcalina (MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50), vazão: 1,2 mL min ⁻¹), durante o teste de estabilidade com fase móvel alcalina.....	59
Figura 12. - Avaliação da coluna Hypersil ODS, em fases móveis neutra e alcalina, durante o teste de estabilidade com fase móvel alcalina. Mesmas condições da Figura 11.....	59
Figura 13. - Cromatogramas da coluna Davisil (PMOS) avaliada em fase móvel neutra a 1,2 mL min ⁻¹ , após a passagem de a) 35 mL e b) 195 mL de fase móvel alcalina.....	61
Figura 14. - Cromatogramas da coluna Davisil (PMOS) avaliada em fase móvel alcalina a 1,0 mL min ⁻¹ , após a passagem de a) 27 mL e b) 195 mL de fase móvel alcalina.....	61
Figura 15. - Cromatogramas da coluna Hypersil ODS avaliada em fase móvel neutra a 1,2 mL min ⁻¹ , após a passagem de a) 38 mL e b) 211 mL de fase móvel alcalina.....	62
Figura 16. - Cromatogramas da coluna Hypersil ODS avaliada em fase móvel alcalina a 1,0 mL min ⁻¹ , após a passagem de a) 39 mL e b) 219 mL de fase móvel alcalina.....	62
Figura 17. - Comportamento da coluna de sílica zirconizada com variação do pH e temperatura de 60 °C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + NaOH (50:50), vazão: 1,2 mL min ⁻¹ . Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H ₂ O (70:30), vazão: 0,3 mL min ⁻¹	64

Figura 18.- Cromatogramas do comportamento da coluna de sílica zirconizada com o pH, avaliadas em fase neutra.....	65
Figura 19.- Repetibilidade de colunas testadas pelo novo método. Condições testes: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + NaOH, pH 10 (50:50), 60°C, a 1,0 mL min ⁻¹ . As avaliações foram feitas na mesma fase móvel alcalina e vazão. Hypersil ODS, Davisil Zr-(PMOS) e Novapak C18.....	66
Figura 20.- Cromatogramas das colunas de Davisil Zr (PMOS) no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade.....	67
Figura.21.- Cromatogramas das colunas de Novapak-C18 no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade.....	68
Figura 22.- Cromatogramas das colunas de Hypersil ODS no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade.....	68
Figura 23.- Imagens no SEM das fases estacionárias iniciais (a) Novapak C18 e (b) Davisil Zr-(PMOS).....	72
Figura 24.- Imagens no SEM das fases estacionárias em partes diferentes da coluna Novapak C18 após a degradação: (a) entrada, (b) meio e (c) saída.....	73
Figura 25.- Distribuição do tamanho de partículas da fase estacionária da coluna Novapak C18, antes e após a degradação.....	74
Figura 26.- Imagens no SEM das fases estacionárias em partes diferentes da coluna Davisil Zr-(PMOS) após a degradação: (a) entrada, (b) meio e (c) saída.....	75
Figura 27.- Imagens no SEM das fases estacionárias Davisil Zr-(PMOS) (a) inicial e (b) meio (após a degradação), mostrando as rachaduras na superfície da sílica.....	76
Figura 28.- Distribuição do tamanho de partículas da fase estacionária da coluna Davisil Zr -(PMOS), antes e após a degradação.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.-Características das colunas comerciais usadas nos experimentos preliminares.....	39
Tabela 2.- Características das colunas utilizadas no novo procedimento de avaliação da estabilidade.....	41
Tabela 3.- Parâmetros cromatográficos antes e após os testes de estabilidade para ambas colunas.....	50
Tabela 4.- Parâmetros cromatográficos das colunas Hypersil ODS e Davisil (PMOS), quando avaliadas em fase móvel neutra e alcalina.....	63
Tabela 5.- Porcentagem de carbono (% C) presente nas fases estacionárias testadas pelo novo procedimento, antes e depois de degradadas.....	69

I. INTRODUÇÃO

I.1.-PRÍNCIPIOS BÁSICOS DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das mais eminentes técnicas de instrumentação analítica na atualidade, devido às características que ela apresenta como: boa capacidade de analisar misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, compostos iônicos e ionizáveis e substâncias de baixa e alta massas molares, com boa detectabilidade, sem apresentar problemas de decomposição térmica ou química, além da possibilidade de automatização. Porém, apresenta ainda algumas limitações como a falta de um detector que seja simultaneamente universal e sensível e o alto custo de operação e instrumentação.

O processo cromatográfico em CLAE baseia-se na distribuição das espécies químicas a serem analisadas entre duas fases, sendo que uma permanece estacionária e a outra move-se através dela e, por isso, é chamada de fase móvel. A separação dos componentes da amostra ocorre pelas diferenças dos coeficientes de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária¹.

Os mecanismos de retenção em Cromatografia Líquida consistem de repetidas etapas de sorção e dessorção ou de partição que acontecem durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da coluna cromatográfica. Os processos físicos de sorção e dessorção são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares e os de partição baseiam-se na diferença de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária.

As fases estacionárias utilizadas em CLAE basicamente são formadas por um suporte sólido sobre o qual existem líquidos depositados^{2,3} ou imobilizados⁴⁻⁸ ou até quimicamente ligados⁹⁻¹². Em cromatografia o uso de fases estacionárias com um líquido depositado, imobilizado ou não, é classificado como Cromatografia Líquido-Líquido. Já quando o líquido é quimicamente ligado tem-se a Cromatografia Líquida com Fase Ligada. Dependendo da polaridade do grupo funcional presente na fase líquida, são encontradas dois tipos de fases estacionárias: fases normais e fases reversas. No modo fase normal, a fase móvel é mais apolar que a fase estacionária e na fase reversa, ocorre o inverso.

I.2.- FASES ESTACIONÁRIAS DO TIPO REVERSAS

As fases reversas, de natureza apolar, são as mais utilizadas em CLAE. Nestas fases o grupo funcional (R) está composto por um hidrocarboneto alquil ou aril, sem grupos quimicamente ativos. Como exemplo destes grupos estão cadeias de C1, C4, C8, C18, cicloexil, fenil, etc. Dentre eles, os grupos alquil mais populares são n-octil e n-octadecil^{13,14}.

Entre as vantagens que estas fases apresentam estão: o uso de fases móveis de menor custo e menor toxicidade, já que a água é utilizada como um dos componentes da mistura; estabilidade frente a solventes; rápido equilíbrio da coluna após a troca de fase móvel; possibilidade de utilizar técnicas de programação, incluindo eluição por gradiente; maior rapidez de análises com reprodutibilidade dos tempos de retenção e amplo campo de aplicação.

Como desvantagens estão: o intervalo restrito de pH no uso da fase estacionária e a presença de grupos silanóis, que vão afetar na separação de solutos básicos, quando usada a sílica como suporte.

I.2.1.- SUPORTES CROMATOGRÁFICOS

Em colunas de fase reversa diferentes materiais têm sido usados como suporte cromatográfico, tais como, polímeros porosos, carbono vitrificado e óxidos de metais, entre eles, alumina (Al_2O_3), zircônia (ZrO_2), titânia (TiO_2) e sílica (SiO_2).

A maioria das colunas usam como suportes partículas de sílica porosa, pelas características que esta apresenta quanto a eficiência, rigidez e desempenho, além de possibilitar modificações químicas na sua superfície, permitindo produzir materiais com diferentes seletividades. A sílica apresenta boa reprodutibilidade e é disponível comercialmente numa grande faixa de tamanho de partículas e tamanho de poros com custos moderados¹⁵.

Entretanto, a sílica apresenta algumas desvantagens que podem limitar as separações a serem realizadas. Segundo mostra a Figura 1, a superfície da sílica apresenta três tipos de grupos silanóis: isolados ou livres, geminais e vicinais^{16,17}, que podem afetar o mecanismo de retenção de uma maneira indesejável. Estes grupos, de

caráter polar, podem provocar adsorção irreversível de compostos básicos, deteriorando o leito da coluna. Quando ocorre adsorção reversível, as eficiências geradas são baixas, aparecendo picos largos, assimétricos e com cauda. Também, o uso da sílica como suporte está limitado pelo pH da fase móvel, podendo ocorrer dissolução da mesma quando são usadas fases móveis alcalinas ($\text{pH} > 7$).

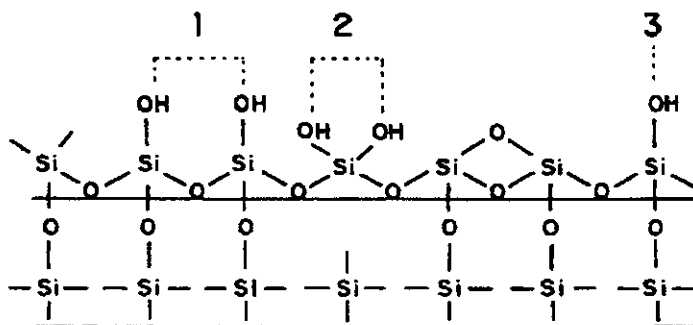


Figura 1.- Tipos de silanóis na superfície da sílica gel amorfa: (1) vicinais, (2) geminais e (3) isolado^{16,17}.

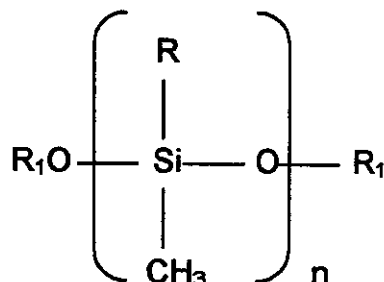
A maioria das sílicas usadas em cromatografia contem níveis significativos de metais, como Fe, Ca, Cu, Mg, Al, etc., que podem influenciar no processo cromatográfico, produzindo picos com cauda para determinados compostos, sendo este outro dos problemas que ela apresenta. Existem procedimentos de tratamento da sílica com ácidos, para reduzir parte destes metais, sendo o mais usado a lavagem da sílica com HCl ¹⁸. Estes tratamentos reduzem bastante o conteúdo de metais na sílica, no entanto não os elimina completamente, devido a sua oclusão dentro da estrutura da sílica.

I.2.2.- FASES LÍQUIDAS

As fases estacionárias líquidas a serem utilizadas devem ser resistentes aos componentes da amostra e, especialmente à fase móvel, além de possuírem seletividades adequadas para a separação. Diferentes polímeros preenchem estes requisitos, porém uma das classes mais comuns de polímeros utilizados é a dos

polissiloxanos, cujas seletividades são dependentes dos grupos substituintes existentes nas estruturas, como poli(etilmetilsiloxano), poli(metiloctilsiloxano), poli(metilfenilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano).

Os poli(metilalquilsiloxanos) apresentam a fórmula geral¹⁹.



onde: R= octil, dodecil, hexadecil, octadecil, etc

R₁= trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

I.3.- CONDIÇÕES DE ANÁLISES PARA COMPOSTOS IONIZÁVEIS

Fases móveis com valores de pH relativamente baixos (pH ≤ 3) são as preferidas para separar compostos básicos por CLAE de fase reversa, devido a maior solubilidade dos solutos, completa ionização dos mesmos, presença dos silanóis restantes na forma não ionizada e fácil remoção dos reagentes em análises subsequentes. Nestas condições, as separações são mais estáveis e reprodutíveis, com altas eficiências^{15,20}. Porém, às vezes, as separações nestes pH não são possíveis, por instabilidade do soluto, retenção fraca ou problemas de seletividade. Nestes casos, são indicadas condições de separação a pH intermediário (pH 4-8) ou mais altos (pH ≥ 9).

Embora ocorra uma adequada seletividade para compostos ionizáveis em pH intermediário, problemas com a forma dos picos e a reprodutibilidade na retenção podem existir, provavelmente devido a ionização parcial dos solutos básicos ou dos silanóis residuais ou a combinação de ambos.

A operação a altos pH (pH ≥ 10) é potencialmente atrativo, porque os compostos básicos podem ser separados como bases livres, o que minimiza a interação com o suporte de sílica. Aqui os grupos silanóis residuais estão ionizados, não acontecendo as indesejáveis interações eletrostáticas.

I.4.- FASES ESTACIONÁRIAS QUIMICAMENTE LIGADAS

O desenvolvimento de fases estacionárias quimicamente ligadas foi um dos fatores que possibilitou o crescimento explosivo da CLAE durante a década de 80. Atualmente, as fases ligadas no modo fase reversa estão sendo amplamente utilizadas na separação de muitos compostos básicos, como fármacos, produtos agrícolas, peptídeos e proteínas.

Os recheios de fase ligada mais disponíveis comercialmente são do tipo siloxano. Eles são preparados através da reação dos grupos silanóis da superfície da sílica (SiOH) com um organossilano como clorossilano ou alcoxissilano, que contem o grupo funcional desejado (ex. grupos octil ou octadecil), de acordo com a reação 1.



onde: X= cloreto ou grupo alcóxido (etoxi, metoxi)

R= cadeia alifática (ex. C8, C18)

R'= grupos metila ou X

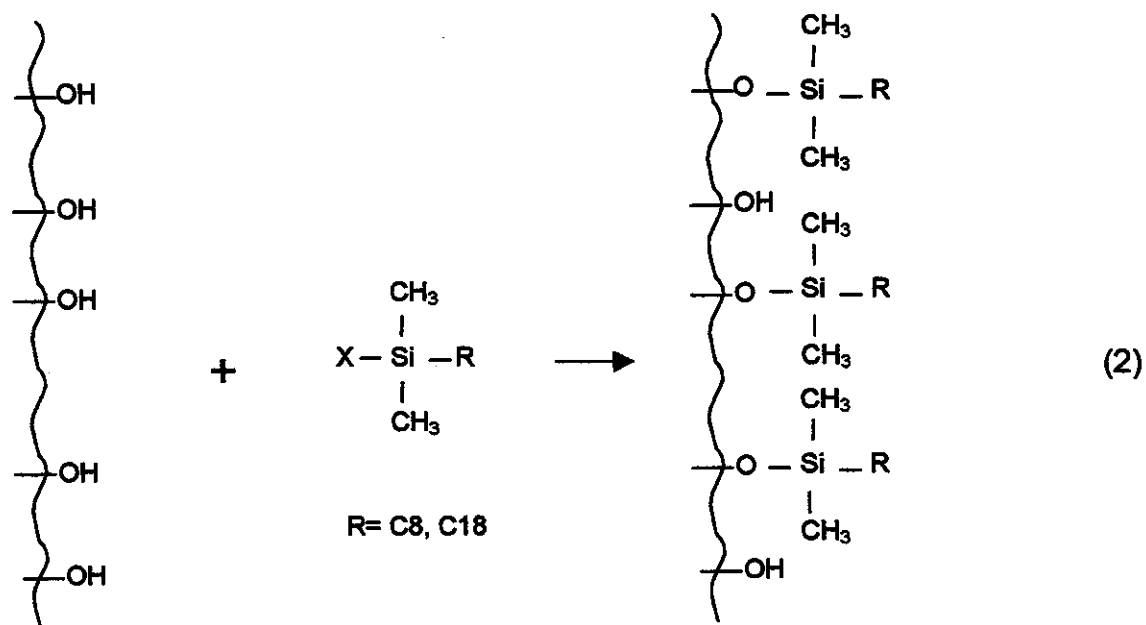
O resultado desta reação é uma espécie com ligação tipo siloxano (Si-O-Si), entre a superfície da sílica e o organossilano, resultando em fases estacionárias onde os grupos R do silano determinam o comportamento cromatográfico da coluna. Superfícies onde reajam mais grupos silanóis darão fases estacionárias mais estáveis e seletivas^{9,10}.

Existem dois tipos de reações possíveis a partir do esquema geral (reação 1).

1) com silanos monofuncionais (presença de um grupo X, XSiR'₂R)

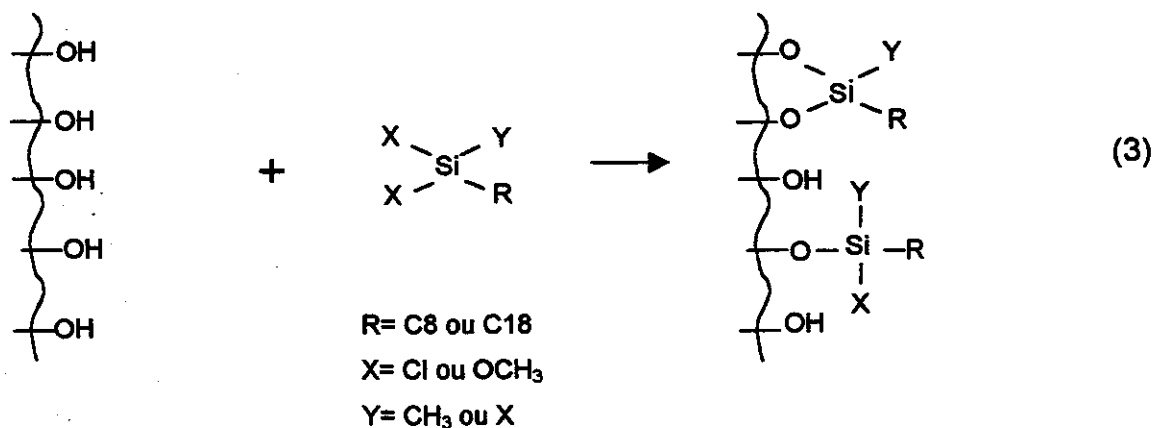
Através desta reação a superfície da sílica é coberta pelo silano na forma de uma monocamada (reação 2). Esta monocamada apresenta excelentes propriedades de transferência de massa, o que produz uma alta eficiência da coluna para a maioria dos solutos com algumas fases móveis. Além disto, estas fases podem ser preparadas

reprodutivelmente. O maior problema encontra-se na sua baixa estabilidade em fases móveis aquosas, particularmente a baixos pH ¹¹.

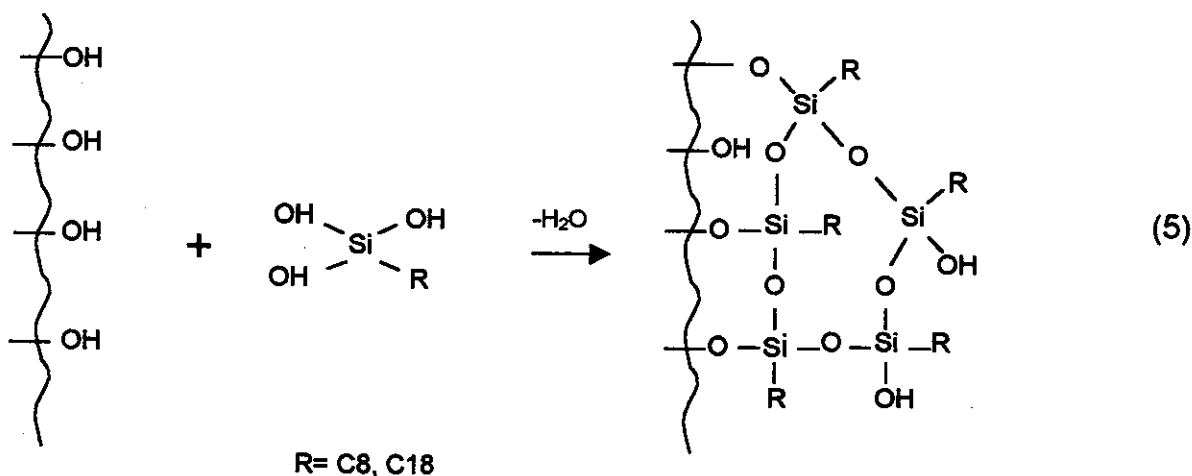
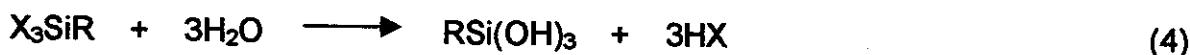


2) com silanos di- ou trifuncionais (presença de mais de um grupo X, $\text{X}_2\text{SiR}'\text{R}$ ou X_3SiR)

2a) Em condições de reação estritamente controladas, especialmente em relação à quantidade de água durante a síntese, são obtidas também monocamadas (reação 3). Neste caso, menos de 2 equivalentes da função X / mol de silano podem reagir com os grupos silanóis presentes na superfície da sílica. O inconveniente destas fases é que quando expostas à água, os grupos X que ficam sem reagir produzem grupos ácidos Si-OH que podem afetar na separação dos solutos básicos²¹.



2b) Nas reações em presença de água o agente silanizante hidrolisa-se, formando grupos hidroxilas (reação 4), que vão reagir com os silanóis da superfície da sílica e entre os próprios grupos hidroxilas da molécula vizinha, formando uma camada polimérica sobre o suporte de sílica (reação 5).



Estas fases poliméricas são mais estáveis à hidrólise, apresentam uma faixa maior de seletividade, além de menos problemas com os silanóis residuais em relação às fases monoméricas. Porém, também apresentam algumas desvantagens como: dificuldades na reprodutibilidade das sínteses, eficiências baixas devido à lenta transferência de massa, produto da espessura da camada polimérica, e presença de grupos residuais de Si-OH na cadeia polimérica que podem afetar a separação.

Colunas de fase ligada proporcionam separações reprodutíveis para uma variedade de condições de fase móvel. Especialmente conveniente, é o rápido re-equilíbrio da fase estacionária com a fase móvel, o qual é uma grande vantagem nas separações em eluição por gradiente. No entanto, a ligação siloxano é relativamente fácil de hidrolisar a baixos pH, produzindo perdas do silano, que será arrastado pela fase móvel^{11, 22}. Esta degradação da fase estacionária vai ser mais acentuada à altas temperaturas e em fases móveis ácidas altamente aquosas, condições estas preferidas para algumas separações de materiais biológicos, proteínas e peptídeos.

As fases estacionárias de cadeia curta degradam rapidamente sobre estas condições. Já as de cadeia mais longa (ex. C18) são mais estáveis à hidrólise e à perda do silano, razão pela qual este grupo funcional é amplamente usado.

Além disso, as colunas baseadas em sílica são instáveis quando usadas fases móveis a pH maiores de 8⁸. No princípio pensava-se que esta instabilidade era também devida a ruptura da ligação siloxano pelo ataque nucleofílico dos íons hidroxila para formar silicatos solúveis²³. Logo, demonstrou-se que a degradação destes recheios a altos pH é uma consequência do ataque da superfície do suporte de sílica pelos íons hidroxila. Tais ataques produzem dissolução do suporte de sílica e possível remoção da fase ligada¹².

Portanto, para evitar os problemas com a hidrólise da ligação siloxano ou com a dissolução do suporte, as fases estacionárias quimicamente ligadas, baseadas em sílica, só devem ser utilizadas com fases móveis no intervalo de pH entre 2 e 8¹.

Outro problema que as fases ligadas a suportes de sílica apresentam é a presença de grupos silanóis residuais, que irão afetar na separação de compostos básicos^{16, 24}, sendo necessário adotar procedimentos que permitam sua cobertura ou remoção.

I.5.-PROCEDIMENTOS DESENVOLVIDOS PARA MELHORAR AS PROPRIEDADES DE FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS

As separações de compostos básicos usualmente são realizadas a pH < 3 ou pH > 8. Porém, muitas fases reversas apresentam uma diminuição de seu tempo de vida útil nestas regiões de pH. Isto estimulou muitas pesquisas para a melhora da qualidade das fases estacionárias quimicamente ligadas, em relação a estabilidade da fase e seu comportamento na separação de solutos básicos, especialmente fármacos, para os quais são desejáveis picos simétricos. Assim, muitas tentativas têm sido feitas na preparação de fases estáveis e seletivas, sem a existência de interações indesejáveis entre o soluto e a fase estacionária.

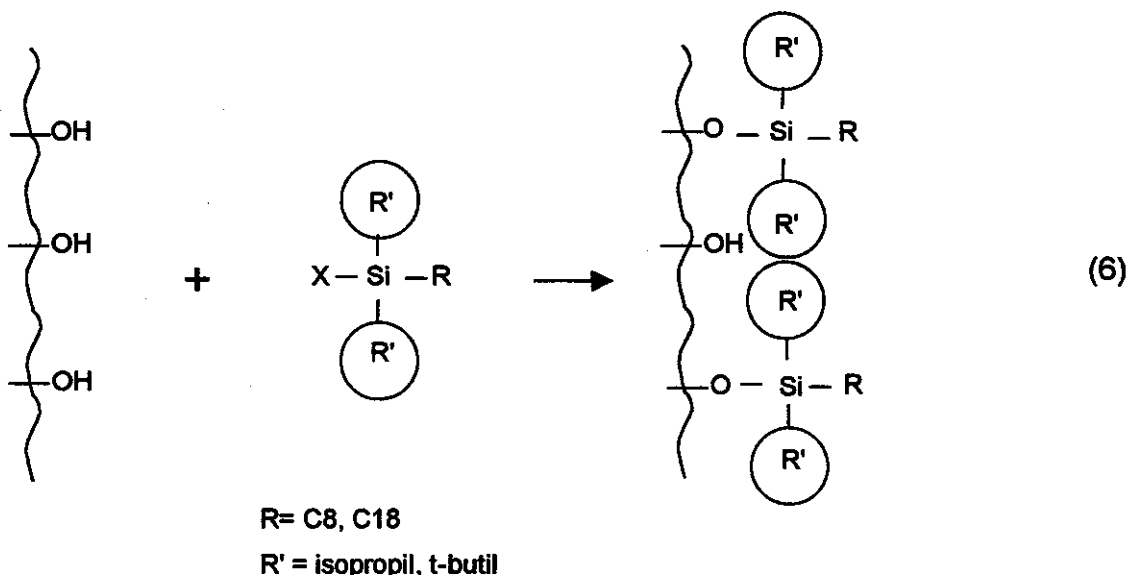
Sabe-se que, além das propriedades do suporte e da densidade de cobertura da superfície pelo grupo ligado, a funcionalidade do agente de ligação e o comprimento da cadeia são parâmetros importantes em relação à estabilidade e à seletividade.

I.5.1.- MODIFICAÇÕES FEITAS EM RELAÇÃO AS FASES LÍQUIDA OU QUIMICAMENTE LIGADA

I.5.1.1. Fases estacionárias monoméricas estericamente protegidas

Estas fases foram desenvolvidas para superar as desvantagens da estabilidade das fases estacionárias monoméricas dimetil substituídas, enquanto mantêm similares retenção e eficiências.

O método de preparação (reação 6) baseia-se na utilização de agentes silanizantes monofuncionais, contendo grupos alquila como isopropil ou terbutil, que irão proteger estericamente as ligações siloxano da hidrólise, permitindo maiores estabilidades das fases ligadas baseadas em sílica em meios ácidos^{11, 25-28}.



I.5.1.2. Fases estacionárias imobilizadas

A superfície da sílica é coberta por uma camada polimérica que posteriormente será imobilizada por entrecruzamento entre as cadeias poliméricas. Esta imobilização pode ser promovida de várias maneiras: usando temperatura, radiação gama, agentes reticulantes como peróxidos, etc.^{4-7, 29-34}. Às vezes, além do entrecruzamento das cadeias poliméricas podem ocorrer ligações químicas entre estas cadeias e o suporte.

Estas fases apresentaram estabilidade superior e propriedades de proteção melhores, em relação às fases ligadas convencionais, assim como excelentes propriedades na separação de solutos básicos.

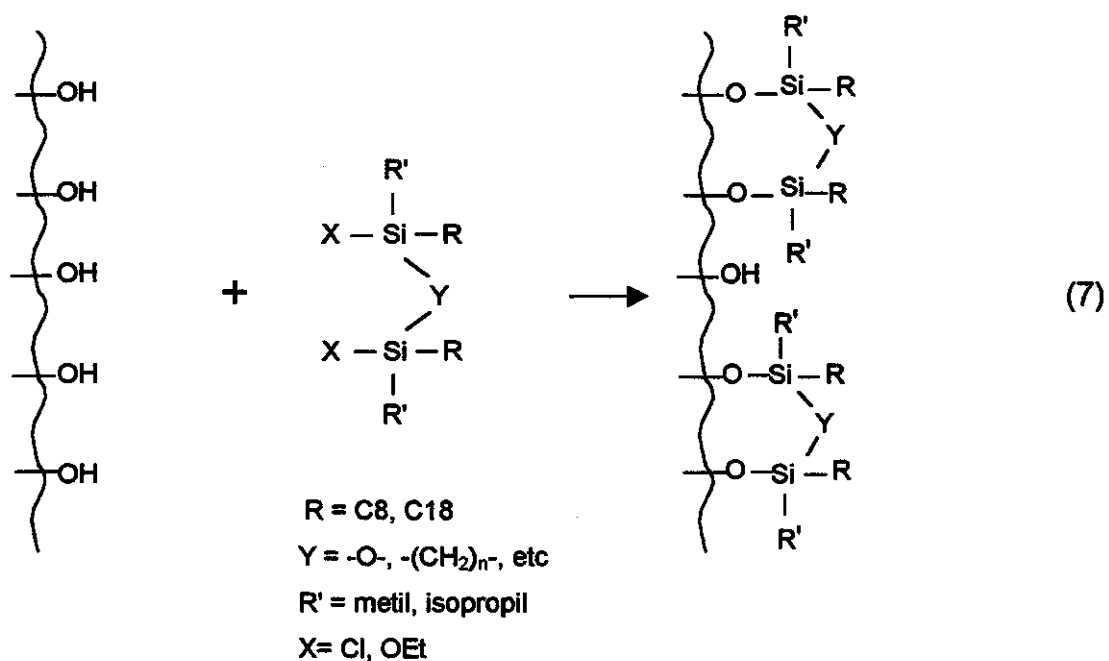
1.5.1.3. Fases estacionárias capeadas

Para preparar estas fases é feita uma segunda reação de silanização, que tem como intuito minimizar a presença dos silanóis residuais. No processo de capeamento os silanóis residuais reagem com organossilanos pequenos como triclorometilsilanos, trimetilclorossilanos, dimetildiclorossilanos, etc. O uso de hexametildisilazona ou bis-trimetilsililacetamida também provaram ser úteis na melhora do comportamento das fases ligadas³⁵, apresentando altas eficiências. A utilização destas fases é limitada em pH muito ácido, porque a ligação destes grupos com a sílica é facilmente hidrolisada, sendo mais estáveis a pH intermediários.

1.5.1.4. Fases estacionárias bidentadas

As fases estacionárias bidentadas são preparadas com silanos bifuncionais, que contêm um sítio reativo em cada um dos dois átomos de silício do silano (reação 7). Estes dois átomos de silício vão estar unidos por grupos -O- ou $-(CH_2)_n-$, que vão servir de ponte, permitindo diferentes espaçamentos entre os dois átomos de silício, os quais, por sua vez, sustentam os grupos volumosos R. Isto possibilita reações mais favoráveis com os grupos silanóis da superfície da sílica, permitindo altas eficiências da coluna com picos simétricos.

Estas fases apresentam uma alta cobertura devido ao efeito estérico e reagem com uma maior população de grupos silanóis. As suas estabilidades estendem-se desde baixos a altos pH, apresentando estabilidades superiores às fases estacionárias monofuncionais, a altos pH, enquanto mantêm as mesmas vantagens, em relação a reprodutibilidade, eficiência e simetria dos picos¹¹. Quando os grupos metil (R') são trocados por grupos mais longos as fases mostram uma maior proteção contra reações indesejáveis¹¹.

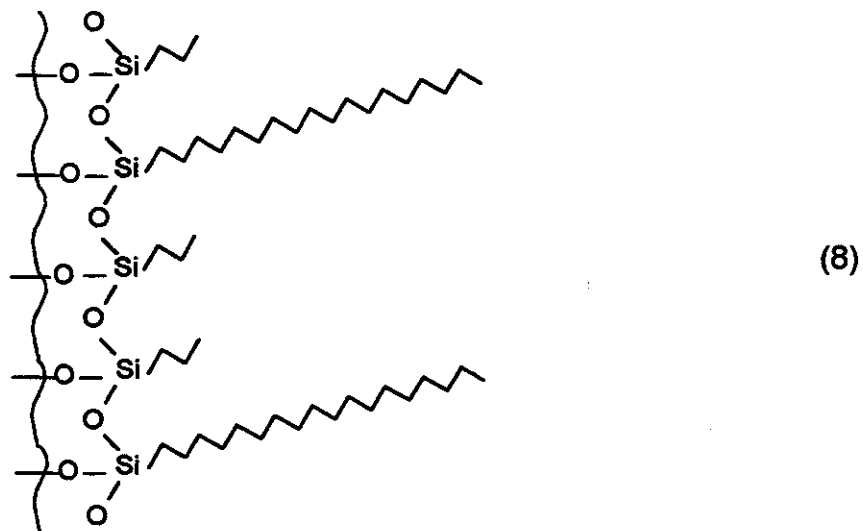


1.5.1.5. Fases estacionárias polimerizadas horizontalmente

O método é baseado na polimerização de uma mistura de cadeias alquílicas curtas (CH_3SiCl_3) e compridas ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}\text{Cl}_3$) de triclorossilanos nos poros da sílica sob condições anídras (reação 8). Neste caso, é necessária uma monocamada de água adsorvida somente na superfície do suporte para que aconteça a polimerização de forma horizontal restrita à superfície.

Durante a polimerização os reagentes silanizantes trifuncionais são ligados um ao lado do outro e também à superfície da sílica, formando um filme polimérico ordenado e denso. Estas fases apresentam uma forte ligação entre as cadeias curtas e longas de silanos e a superfície do suporte³⁶.

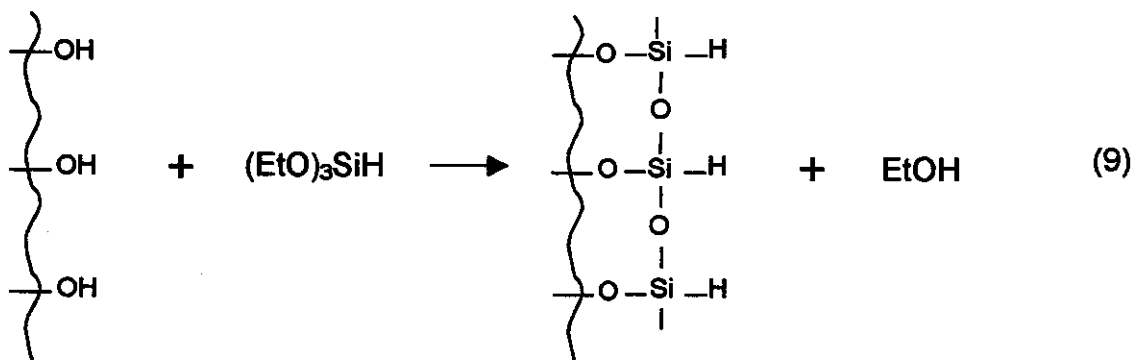
As fases polimerizadas horizontalmente são relativamente estáveis a baixos pH e apresentam melhor reprodutibilidade sobre as outras fases poliméricas convencionais, com uma baixa atividade dos grupos silanóis residuais³⁷. Além disto, estudos de estabilidade mostraram que estas fases apresentam uma alta resistência tanto a fases móveis ácidas como básicas^{38,39}. A seletividade destas fases é parecida com as fases monoméricas, porém, ainda não estão disponíveis comercialmente.



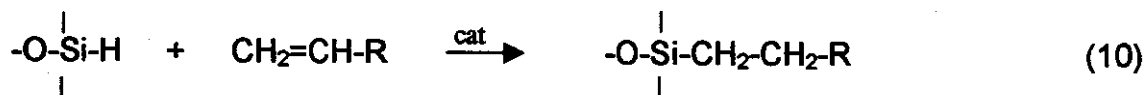
1.5.1.6. Fases estacionárias sintetizadas com hidreto intermediário

Esta modificação foi feita em suportes de alumina, zircônia e titânia com bons resultados. O procedimento consta de duas etapas⁴⁰.

1) Uma monocamada polimérica superficial de polissiloxanos com grupamentos hidretos ($\equiv \text{Si-H}$) é formada pela silanização da superfície do suporte com o produto de hidrólise do trietoxissilano (reação 9).



2) Hidrocarbonetos terminais insaturados (ex. 1-octadeceno) são ligados ao polissiloxano na presença de um catalisador adequado (reação 10).



Apesar da complexidade, este método produz um recobrimento de alta densidade de cadeias alquilas sobre o suporte, devido a pequena limitação estérica durante a reação de introdução destas cadeias sobre a superfície polimérica. Este recobrimento também proporciona uma alta estabilidade à hidrólise.

Os métodos de recobrimento com hidreto intermediário e polimerização horizontal produzem recobrimentos semelhantes sobre a superfície da sílica, embora o número de cadeias alifáticas ligadas ao suporte seja maior no primeiro caso, devido à menor limitação estérica durante a etapa de polimerização superficial. Por outro lado, o método de polimerização horizontal é bem mais simples e rápido.

1.5.1.7. Fases estacionárias encapsuladas

Nestas fases, o suporte é encapsulado com uma camada polimérica, como polimetilsiloxanos, ligantes alquilas substituídos de cadeias longas, polibutadienos, etc^{35, 41-43} e posteriormente procede-se a copolimerização da sílica modificada.

Fases estacionárias foram preparadas para a separação de compostos aromáticos, pela adsorção de polivinilamina^{44, 45} e copolímeros de vinilamina/álcool vinílico⁴⁶, os quais foram reticulados sobre a sílica. Após esta etapa, introduziram-se ciclodextrinas que foram quimicamente ligadas às cadeias do polímero.

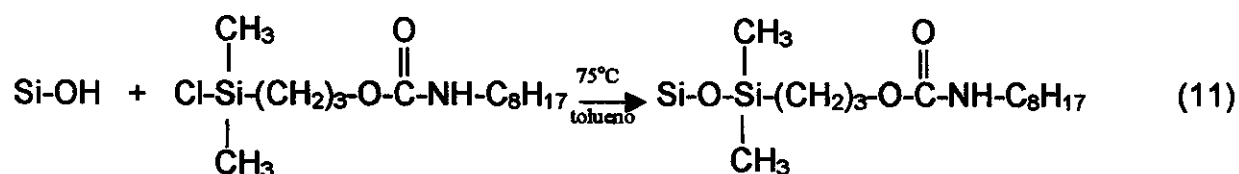
O pré-capeamento sobre o suporte da sílica com trimetilsilano, antes da cobertura com polímero⁴⁷, também reduz a concentração de grupos silanóis com um decréscimo nas interações destes grupos. Estas fases mostraram um bom desempenho na separação depois dos testes de estabilidade com soluções tampão a altos e baixos pH, porém, foi observada uma pequena mudança na seletividade.

A estabilidade a altos pH das fases encapsuladas é superior às fases silanizadas convencionais e os solutos básicos são eluídos com picos simétricos, sem precisar da adição de ácidos ou bases ou agentes de par iônico na fase móvel³⁵.

1.5.1.8. Fases estacionárias ligadas com grupo polar embutido

O'Gara *et al.*⁴⁸ reportaram uma nova fase ligada que contém um grupo interno polar de carbamato na cadeia do silano. A síntese da fase consistiu de duas reações

orgânicas iniciais para introduzir o carbamato no organossilano, neste caso clorossilano monofuncional, e a posterior ligação do produto obtido com o suporte de sílica (reação 11). O método permitiu modificações homogêneas e reproduzíveis na superfície da sílica.



A fase ligada de octilcarbamato mostrou uma menor retenção e cauda dos picos para solutos básicos e polares, comparados com as fases de octildimetilsilil capeadas. Estas fases apresentaram seletividades diferentes das fases ligadas C8 convencionais, podendo ser úteis na separação de compostos que apresentam interações indesejáveis com os silanóis da superfície.

1.5.2.- MODIFICAÇÕES FEITAS EM RELAÇÃO AO SUPORTE

1.5.2.1. Substituição da sílica como suporte

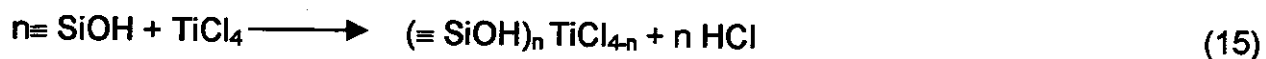
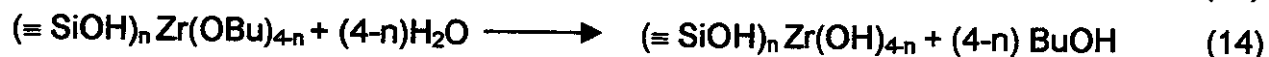
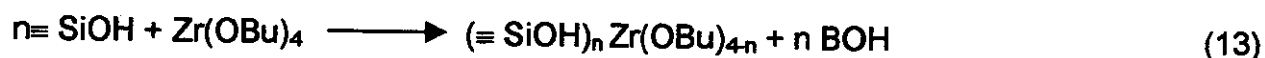
Materiais poliméricos macroporosos de poliestireno e poliacrilamida têm sido usados como fases estacionárias na separação de solutos básicos em altos pH⁴⁹. A principal vantagem destes polímeros é a estabilidade para uma ampla faixa de pH (1-13). Porém, em geral, os polímeros orgânicos não possuem a alta resistência mecânica da sílica e muitos são propensos a se avolumar e a se contrair quando expostos a diferentes solventes ou quando é trocada a composição da fase móvel. Além disso, apresentam eficiências menores que as colunas baseadas em sílica para o mesmo tamanho de partículas.

Também foram pesquisadas algumas fases estacionárias preparadas com suportes de óxidos inorgânicos porosos de alumina, zircônia e titânia, que apresentaram altas resistências mecânicas e uma alta estabilidade para uma faixa de pH maior que a sílica⁵⁰⁻⁵⁷. Porém, estes óxidos não têm tanta variedade comercial,

A superfície química destas fases é semelhante às fases ligadas de sílica, com seletividade e características de retenção similares, além do menor conteúdo de silanóis residuais. Elas fornecem picos com boa simetria, para compostos básicos, e altas eficiências. Outras características foram a excelente resistência mecânica e a alta estabilidade em fases móveis alcalinas (pH 11,5) e elevadas temperaturas⁵⁹.

1.5.1.3. Fases estacionárias com sílica modificada

Fases estacionárias foram preparadas com suportes de sílica modificada com átomos de um metal de transição como, por exemplo: Ti^{60, 61} ou Zr^{62, 63}. Neste caso, os silanóis reagem primeiramente com o alcoóxido ou cloreto do metal (reações 13 a 16), modificando a superfície da sílica. Em seguida, o suporte é recoberto com PMOS e posteriormente imobilizado. Estas fases mostraram boa estabilidade em altos pH, com bom desempenho cromatográfico.



Nobuhara et al.⁶⁴ obtiveram uma fase estacionária baseada em sílica porosa recoberta com óxido de magnésio. Os resultados mostraram que as propriedades físicas e morfológicas da sílica mantiveram-se. Esta fase apresentou uma diminuição dos grupos silanóis residuais, em relação à sílica não modificada, provocando mudanças nos mecanismos de separação de compostos ácidos e básicos. Ela mostra-se bastante promissora, sendo que não apresentou as interações indesejáveis com amostras básicas.

I.5.2.4. Fases estacionárias preparadas com sílica sol-gel

Estudos mostram que certas colunas podem ter usos de rotina a pH 9 ou mais, em certas condições de operação^{12, 65-68}, especialmente colunas de fase ligada baseadas em sílica feitas por processos sol-gel. Estas colunas mostram superior resistência à dissolução a altos pH, o que resulta em estabilidades maiores, permitindo métodos de separação mais robustos e reprodutíveis^{67, 68}.

Em trabalho de Kirkland⁶⁹, fases monofuncionais não capeadas, feitas a partir de suportes de sílica sol-gel, mostraram uma estabilidade surpreendente a pH > 10 para determinadas fases móveis. Também, quando usadas fases móveis com NaOH a pH 12, estas colunas mostraram propriedades que sugerem a possibilidade de separações cromatográficas em tais condições, assim como possibilitou lavagens periódicas com uma solução de NaOH, para retirar materiais fortemente retidos na coluna (ex. endotoxinas). Apesar das separações a pH 12 com suportes de sílica sol-gel serem possíveis, trabalhar nestas condições pode diminuir o tempo de vida da coluna, pela solubilização do suporte de sílica.

I.6.- FATORES QUE ACELERAM A DEGRADAÇÃO DA COLUNA

A estabilidade das colunas de fase ligada baseadas em sílica está diretamente relacionada com o tipo e pureza do suporte de sílica e a natureza da fase ligada, mas também vai depender fortemente das condições de análise como: pH da fase móvel, temperatura, tipo e concentração do tampão e modificador orgânico utilizados na fase móvel.

Kirkland *et al.*^{67, 68, 70, 71} baseados em estudos anteriores, definiram melhor a influência destes fatores na dissolução da sílica em valores de pH intermediários e altos. Eles comprovaram que a solubilidade da sílica, geralmente, é maior quando são usadas fases móveis tamponadas em metanol, comparadas com as preparadas em acetonitrila. No entanto, isto não aconteceu para as fases monoméricas estericamente protegidas, que mostraram solubilidades similares da sílica em ambos os solventes.

A influência da natureza da fase ligada foi estudada¹², comparando fases monoméricas de dimetil-C18 e de diisopropil-C8. Neste estudo foi observado que as

fases protegidas estericamente foram mais rapidamente degradadas, contrariamente ao que acontece a baixos pH. Ligantes maiores também inibem o ataque da superfície da sílica por soluções tampão agressivas, a altos e baixos pH^{11, 72}.

Sílicas xerogel (sil-gel) e sol-gel foram comparadas, sendo que as tipo xerogel dissolveram mais rapidamente, devido a maior área superficial e volume de poros. Sílicas que contêm elementos contaminantes de metais na sua estrutura (tipo A) mostraram menor solubilidade que as sílicas altamente purificadas (tipo B)⁶⁷. Por outro lado, estes metais incrementam a acidez da superfície da sílica.

Colunas baseadas em sílica apresentaram diferentes solubilidades, dependendo do tipo de tampão utilizado. No estudo dos ânions, tampões de carbonato e fosfato degradaram estas colunas mais rapidamente que os tampões de borato e glicina. Para o caso dos cátions, a solubilidade da sílica foi diminuindo na seguinte direção: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. Alguns resultados⁶⁹ indicam que o uso de tampões de lítio podem reduzir a dissolução do suporte de sílica e, assim, melhorar a estabilidade da coluna a altos pH. Altas concentrações de tampão ($> 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e elevadas temperaturas ($> 40^\circ\text{C}$), influenciam fortemente na degradação da coluna.

Resumindo, fases móveis com altos pH e que apresentem as seguintes características:

- a) tampões de carbonato e fosfato (bem mais agressivos que os tampões orgânicos e boratos)
- b) tampões com concentrações maiores que $0,05 \text{ mol L}^{-1}$
- c) temperaturas maiores que 40°C
- d) utilização do metanol como modificador orgânico ao invés da acetonitrila

aumentam a velocidade de dissolução da sílica e, portanto, diminuem o tempo de vida útil da coluna.

O tempo de vida útil das colunas também pode ser afetado por fatores de contaminação por materiais estranhos presentes na amostra, no injetor ou nos selos das bombas que entram na coluna, sendo acumulados no topo, provocando deterioração irreversível do desempenho da mesma.

O uso de filtros e de colunas de guarda podem prevenir ou reduzir estes problemas. As colunas de guarda são de grande utilidade devido a seu poder de retenção, uma vez que tudo que possa causar deterioração na coluna analítica será

retido pela coluna de guarda, independente da natureza da causa. Além disso, permitem saturar parcialmente a fase móvel com sílica, diminuindo a possibilidade da dissolução da sílica da fase estacionária da coluna cromatográfica.

No entanto, a coluna de guarda precisa ser trocada a cada certo período de tempo, frequência esta que depende da natureza da matriz da amostra a ser analisada e do procedimento de preparação e de limpeza utilizado na mesma.

I.7.-CONSIDERAÇÕES RELACIONADAS COM O TEMPO DE VIDA DAS COLUNAS

O tempo de vida de uma coluna é definido individualmente para cada tipo de separação cromatográfica e vai depender do grau de perda de retenção e resolução a serem toleradas antes da troca da coluna. Com as fases reversas convencionais o primeiro sinal de degradação da coluna é usualmente o decréscimo de fator de retenção (k)³⁵. No caso de colunas mais estáveis a altos pH o k permanece constante, ainda que solubilizações da sílica tenham ocorrido. No entanto, o tempo de vida destas últimas é também limitado onde, depois de um certo tempo e dependendo das condições de análise, o desempenho cromatográfico começa a ser prejudicado. Desta forma, foi tomada a perda da eficiência e não as mudanças no k como uma medida da deterioração da coluna para testes a altos pH. Baseado no anterior o tempo de vida de uma coluna foi definido como a quantidade de fase móvel medida como volume de coluna passado através da coluna cromatográfica antes de iniciar um decréscimo significativo na eficiência.

O fato de um recheio ser estável permite que as características da coluna permaneçam inalteradas tanto tempo quanto seja possível, reduzindo assim a frequência de substituição da mesma. Por isso, métodos para avaliar a estabilidade de fases ligadas tem sido assunto de muitos estudos. Nestes testes são abordados uma grande variedade de fases estacionárias, sendo as fases estacionárias capeadas as mais estudadas. Alguns deles ^{2, 7, 11, 35, 39, 61, 63, 66-68, 70, 73-75} são sumarizados no Anexo I.

Para estes estudos foram utilizadas diversas condições de análise, não existindo um procedimento geral estabelecido. Os métodos mais recentes ^{67, 68, 70, 71, 75} utilizam grandes volumes de fase móvel, devido a disponibilidade de fases estacionárias cada vez mais resistentes ao ataque de fases móveis. Alguns testes de estabilidade,

realizados em colunas de Hypersil ODS, Novapak-C18 e Zorbax RX-C18, requisitaram 82, 57 e 50 L de fase móvel alcalina, quando testadas a pH 9 e temperatura ambiente. Para valores de pH de 11,5, utilizando tampão de pirrolidina e temperaturas de 40°C, colunas de Zorbax XDB-C18 faliram somente depois de passar 60 L de fase móvel alcalina.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método de avaliação da estabilidade de fases estacionárias com o uso de menor quantidade de solvente e menor tempo de análise. Para atingir este objetivo as etapas envolvem:

- Estabelecer o comportamento de colunas de fase reversa em relação aos parâmetros de temperatura, pH, vazão da fase alcalina que passa através da coluna e fase móvel utilizada para fazer as avaliações;
- Estabelecer procedimentos menos onerosos para estudar a estabilidade de colunas de fase reversa;
- Comparar o comportamento de colunas preparadas no LABCROM com colunas comerciais.

III. PARTE
EXPERIMENTAL

III. 1.- Materiais

III.1.1.- Reagentes e solventes

- Metanol p.a, Mallinckrodt
- Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- Acetona p.a, Merck
- Benzonitrila, Riedel - de Haën
- Benzeno p.a, Synth
- Tolueno p.a, Merck
- Naftaleno , Carlo Erba
- Ácido nítrico p.a, Nuclear
- Diclorometano p.a, Merck
- Hidrogênio carbonato de sódio, Fisher Scientific Company
- Hidróxido de sódio, Nuclear
- Clorofórmio, Mallinckrodt

III.1.2.- Fase estacionária líquida e suporte

- Fase estacionária líquida: poli (metiloctilsiloxano), PMOS, United Chemical Technologies, Inc., Lote N° 145-041. Massa molar ~6000 daltons.
- Suporte de sílica, Davisil; forma das partículas: irregular; tamanho médio de partículas: 11,3 μm ; volume de poro: 0,75 mL/g SiO_2 ; área de superfície específica: $\approx 350 \text{ m}^2/\text{g SiO}_2$; tamanho de poro: 8,7 nm.

III. 1.3.- Coluna cromatográfica

O corpo das colunas cromatográficas foi confeccionado na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP com tubos de aço inoxidável 316. A superfície interna do corpo da coluna foi polida, através da passagem no interior do tubo, de um fio de aço envolto com lã de aço e pasta de polimento fixado em uma furadeira. Após o

polimento, estes tubos foram lavados com ácido nítrico 50 %, água, detergente, acetona e metanol, com o objetivo de deixar a superfície interna livre de impurezas.

Foram usadas colunas de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno.

III.2.- Equipamentos

- Cromatógrafo líquido constituído de:
 - duas bombas de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Waters, modelo 510
 - detector UV/Vis, de comprimento de onda fixa de 254 nm, Alltech, modelo 450
 - injetor, do tipo Rheodyne, modelo 7725i
 - forno de coluna, Waters, modelo RCM-100
 - sistema de aquisição de dados: microcomputador do tipo PC, IBM, pentium II 400 MHz, com software de sistemas de dados cromatográficos Chrom Perfect, modelo 3.2
 - controlador de gradiente, Waters, modelo 680
 - módulo de controle de temperatura, Waters, modelo TCM
- Bomba de enchimento de colunas, marca Haskel, com faixa de pressão disponível de 0-15000 psi, modelo N° 51769
- Sistema de ultra-som, Thornton, modelo T 14
- Agitador rototorque, Cole - Parmer, modelo N° 7637-01
- Balança analítica, Fischer Scientific, modelo A-250
- Sistema de purificação de água Milli - Q Plus, Millipore
- Estufa com vácuo, Yamato ADP-21
- pH-metro, Digimed, modelo DC21

III.3.- Preparação da fase estacionária

III.3.1.- Lavagem da sílica

Durante a preparação da sílica muitas impurezas de metais podem ficar dentro ou na sua superfície, que posteriormente irão afetar a separação de compostos básicos. Lavagens com ácidos são feitas na sílica para eliminar parte destes metais¹⁸.

Para a lavagem, uma quantidade adequada de sílica foi colocada num tubo de ensaio, sendo lavada com HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por agitação no agitador rototorque durante duas horas. Em seguida deixou-se a suspensão em repouso por um período suficiente para observar uma separação definida entre a sílica e a fase aquosa. A fase aquosa foi extraída com pipeta de Pasteur. Após, a sílica foi lavada com água deionizada por duas vezes e colocada na estufa a 120°C , com vácuo de $0,53 \times 10^5 \text{ Pa}$. Posteriormente fez-se lavagens com diclorometano, em duplicata, a fim de dissolver qualquer resíduo orgânico presente na sílica. Por último, o suporte foi secado por evaporação do solvente, primeiro em capela e depois em estufa a 140°C com vácuo de $0,27 \times 10^5 \text{ Pa}$.

III.3.2.- Sínteses da sílica zirconizada

A síntese da sílica zirconizada⁷⁶ foi realizada pela aluna de iniciação científica Glaucia M. F. Pinto (LABCROM), baseada na adaptação do procedimento de Peixoto *et al.*⁷⁷. O processo consistiu na ativação de 70 g de sílica (150°C por 8 h). A seguir adicionou-se 45 mL de uma solução de butóxido de zircônio dissolvido em 300 mL de tolueno anidro. A mistura foi mecanicamente agitada e aquecida à temperatura de refluxo por 12 h, sob atmosfera de nitrogênio seco. O sólido obtido foi lavado (por decantação) com tolueno e aquecido a 150°C para eliminar o solvente. O material seco foi hidrolisado com uma solução aquosa de HNO_3 $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O sólido foi lavado com água e etanol e seco em forno a 120°C por 5 h. O processo pode ser representado pelas equações 13 e 14.

III. 3.3.- Recobrimento do suporte

A preparação das fases estacionárias com sílica nua e sílica zirconizada foi feita através de método de evaporação do solvente, com o contato de massas apropriadas do suporte e do polissiloxano^{34, 78}, onde uma determinada quantidade de PMOS foi dissolvida em diclorometano, de maneira a obter uma solução com 10 % de PMOS. Feito isto, foi adicionado o suporte, previamente ativado por aquecimento a 150°C por 24 h. Uma vez misturados o suporte e o PMOS, agitou-se a suspensão manualmente por alguns minutos e, a seguir, o béquer contendo a mistura ficou em repouso, tampado com papel alumínio, por três horas. Ao final, o solvente foi evaporado na capela, ficando a fase líquida sorvida nas superfícies dos suportes.

A porcentagem de carregamento de PMOS sobre o suporte foi de 50 %, por ser a quantidade ideal para este tipo de fase⁷⁸.

III.3.4.- Imobilização do PMOS sobre a sílica zirconizada

A sílica zirconizada dispõe de um número menor de grupos ativos livres para interagir com o polímero. Para garantir uma maior proteção da sílica à dissolução, foi feita a imobilização do PMOS sobre o suporte, através de radiação gama.

Para imobilizar o polímero porções da fase zirconizada com PMOS sorvido foram colocadas em ampolas de vidro e seladas em condições ambientais. As ampolas foram irradiadas através de uma fonte de cobalto-60 a 120 kGy. Para a irradiação das amostras com raios gama contamos com a colaboração da Indústria Ibras CBO de Campinas.

III. 4.- Enchimento das colunas

III 4.1.- Preparo da suspensão

A concentração da suspensão utilizada para o enchimento da coluna foi de 10 % (m/v). Esta concentração é apropriada para evitar o risco da formação de aglomerados de partículas³⁴. Assim, de acordo com o volume da coluna, uma quantidade adequada

de fase estacionária foi pesada num tubo de ensaio, no qual foi adicionado o solvente de suspensão, que consistiu numa mistura de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (90:10, v/v). A suspensão foi mantida sob agitação constante durante ~14 horas no agitador rototorque.

III.4.2- Procedimento de enchimento das colunas

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o sistema mostrado na figura 2, que consiste de coluna, reservatório de suspensão de 32 mL, bomba de enchimento Haskel, com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1000 a 50000 psi) e cilindro de nitrogênio.

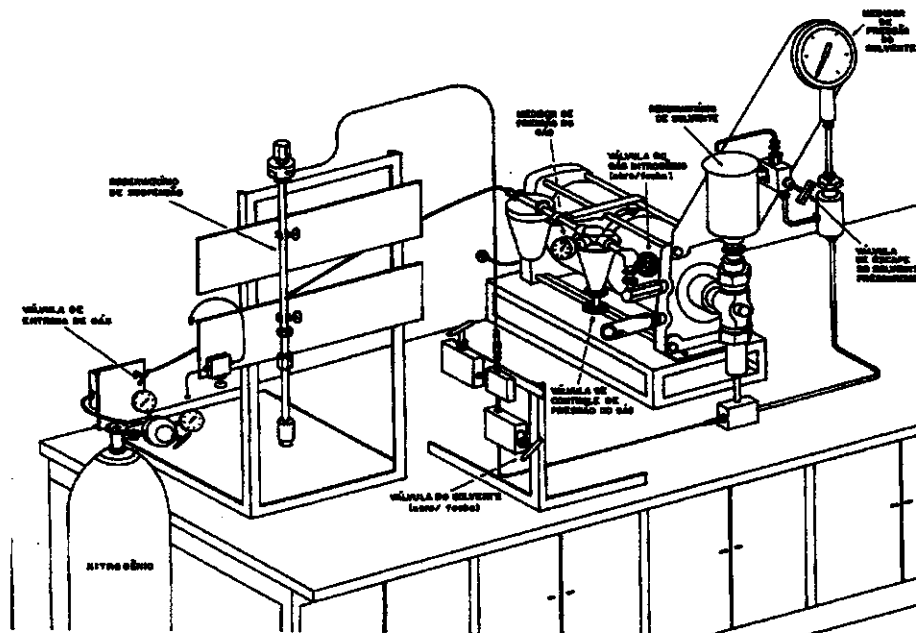


Figura 2.- Esquema do sistema de enchimento

Antes de se iniciar o procedimento de enchimento, foram verificados possíveis vazamentos no sistema. Vazamentos podem gerar variações na pressão durante o enchimento, causando uma distribuição não homogênea da fase estacionária, resultando em perda da eficiência. Para isso a coluna foi acoplada ao reservatório da suspensão, tendo-se o cuidado de colocar um filtro e uma tampa na parte inferior da coluna. Preencheu-se com metanol, tanto o reservatório de suspensão, como do solvente propulsor e, com a válvula de saída do solvente propulsor fechada, acionou-se

a válvula de controle de pressão do gás, até obter uma pressão de 5000 psi. Feito isto, ligou-se a bomba Haskel e abriu-se a válvula do solvente, para detectar pontos de vazamentos e eliminar as possíveis bolhas de ar presentes no sistema. Depois, as válvulas do solvente e de controle da pressão de gás foram fechadas e a bomba desligada. A coluna foi desconectada, permitindo a saída do metanol do reservatório da suspensão.

Para o enchimento da coluna conectou-se novamente a coluna ao reservatório da suspensão, com o filtro na parte inferior para evitar a saída da fase estacionária, sendo que desta vez não foi colocada a tampa. Transferiu-se a suspensão para o respectivo reservatório e completou-se com o solvente de suspensão, até encher o reservatório, fechando a tampa deste em seguida. Colocou-se uma pressão de 5000 psi e abriu-se a válvula de saída do solvente, deixando passar 80 mL de metanol. Fechou-se a válvula do solvente até o metanol parar de gotejar da coluna e, então, abriu-se novamente a válvula de solvente por 20 s. Isto foi feito por mais duas vezes para se obter uma boa compactação da fase estacionária no leito da coluna. Deixou-se a coluna em repouso por 20 minutos para despressurizar o sistema. Desconectou-se a coluna do reservatório e na extremidade da coluna que estava ligada ao reservatório, colocou-se um terminal com filtro, fechando-se as duas extremidades.

III.5.- Fase móvel

Os solventes utilizados para preparar a fase móvel podem conter possíveis impurezas residuais que irão provocar entupimentos nos capilares, danificar as bombas e afetar o desempenho da coluna. Para evitar estes problemas antes de preparar a fase móvel, os solventes foram filtrados com uma membrana de Nylon de 0,45 μm de porosidade. Outro fator que pode prejudicar o processo cromatográfico são as bolhas de ar presentes na fase móvel. Por isso ela foi desgaseificada em ultra-som juntamente com vácuo. As fases móveis estiverem composta por MeOH:H₂O ou MeOH:Solução aquosa básica em diferentes proporções, dependendo da capacidade de separação da coluna.

III. 6.- Condicionamento das colunas

Após o enchimento da coluna, é preciso fazer seu condicionamento com a fase móvel, para eliminar todos os vestígios de solventes usados no enchimento e para a fase estacionária ficar em equilíbrio com a fase móvel.

Quando é feito o condicionamento, a coluna não deve estar acoplada ao detector, para evitar que partículas provenientes da coluna possam obstruir a tubulação de entrada ou saída do detector, ou a cela de detecção. Este condicionamento foi feito por um período de 4 horas, no mínimo, a uma vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O (70:30).

III.7.- Avaliação das colunas

III.7.1.- Mistura teste

As colunas foram avaliadas cromatograficamente com uma mistura orgânica contendo os seguintes compostos neutros de várias polaridades: acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. A mistura foi preparada qualitativamente em concentrações tais que os picos nos cromatogramas apresentassem uma altura razoável, utilizando atenuação e "threshold" adequados. Esta mistura foi dissolvida na fase móvel MeOH:H₂O (70:30) e armazenada na geladeira.

A escolha desta mistura foi baseada em trabalhos anteriores⁷⁹ e tem por objetivo avaliar as colunas quanto à sua performance frente a compostos polares e apolares. O volume de amostra injetado foi de $10 \mu\text{L}$ e a detecção feita em 254 nm .

III.7.2.- Cálculo dos parâmetros cromatográficos

Os cálculos dos parâmetros cromatográficos foram obtidos através do Software "Report Write Plus", que produz relatórios dos dados fornecidos pelo sistema de dados cromatográficos "Chrom Perfect". Os parâmetros calculados foram eficiência (N/m), fator de assimetria (As) e fator de retenção (k). As medidas basearam-se nos

cromatogramas obtidos. Os símbolos são definidos nas Figuras 3 e 4; todas as medidas são em unidades de tempo.

O fator de retenção (k) diz respeito à retenção de um soluto na coluna, determinado pela razão dos tempos que as suas moléculas ficam retidas na fase estacionária ou percorrem a coluna na fase móvel.

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

O tempo de retenção de um soluto (t_R) é o tempo que este gasta desde o momento de injeção até a saída do máximo do pico, ou seja, engloba todo o tempo que o componente fica no sistema cromatográfico. Para saber a parte do tempo que as moléculas do soluto estão na fase móvel é utilizado o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária (t_M). Neste caso, foi tomado o pico do metanol.

Os valores ideais de k devem variar entre 2 e 10, pois valores de k menores de 2 implicam pouca interação do soluto com a fase estacionária. Valores de k maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a fase estacionária, provocando um longo tempo de análise¹.

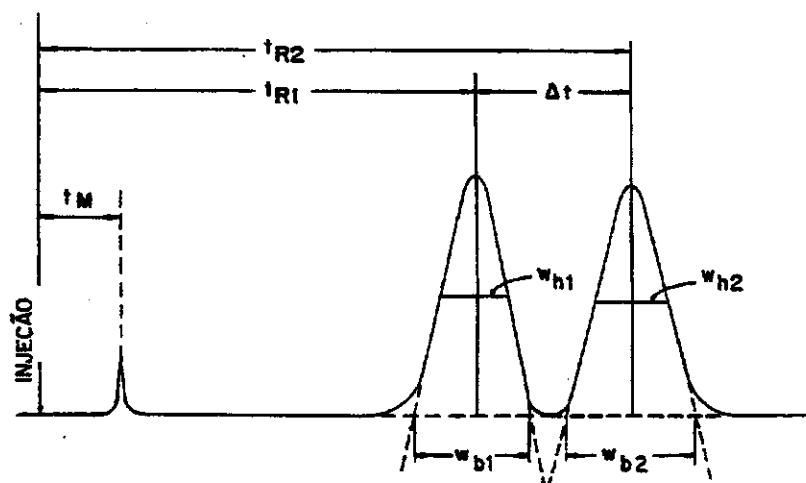


Figura 3.-Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.

A eficiência da coluna cromatográfica é avaliada através do número de pratos, N . O número de pratos representa as etapas de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de etapas de equilíbrio em uma coluna, melhor a separação. Este parâmetro é definido por:

$$N = 16 (t_R / w_b)^2 \text{ ou } N = 5,545 (t_R / w_h)^2$$

onde: w_b e w_h representam a largura do pico na base e à meia altura, respectivamente.

Para comparar colunas de comprimentos diferentes, a eficiência é expressa em termos de números de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

O outro parâmetro calculado é o fator de assimetria do pico (A_s), a 10 % da altura do pico ($A_s = b/a$) (Figura 4). O valor de A_s deve estar no intervalo de 0,9 a 1,2, mas valores até 1,6 também são admitidos⁸.

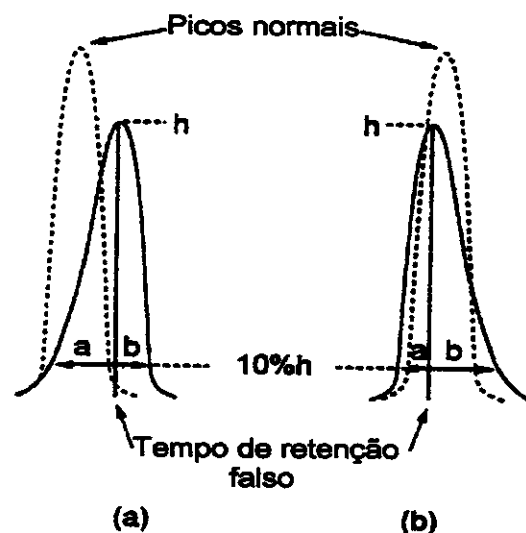


Figura 4 – Cromatogramas com as medidas relacionadas à determinação da assimetria de picos.

III. 8.- Parâmetros avaliados para testes de estabilidade

A estabilidade das colunas foi avaliada através dos parâmetros cromatográficos N/m , k e A_s , sendo o naftaleno o composto escolhido para medir estes parâmetros por ser um composto neutro bastante apolar e ficar mais tempo retido na coluna. Segundo Snyder e Kirkland⁸ o tempo de retenção de compostos neutros está relacionado com a quantidade de fase estacionária orgânica presente.

III.8.1.- Efeito da temperatura

Para este teste foram utilizadas duas colunas recheadas com fases estacionárias preparadas no laboratório, a partir de sílica Davisil como suporte e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) adsorvido nos poros. Dependendo do tempo de armazenagem das fases preparadas, as colunas foram classificadas em coluna A (9 dias) e coluna B (2 meses).

As condições do sistema cromatográfico foram:

- Fase móvel: MeOH:H₂O (60:40, v/v)
- Vazão: 1,2 mL min⁻¹.
- Temperatura: 30 a 60 °C

Após a passagem da fase móvel neutra em teste, em intervalos de volumes determinados, condicionou-se a coluna por 15 a 20 minutos com a mesma fase móvel na vazão a ser utilizada na análise. As vazões usadas para avaliar a evolução do comportamento cromatográfico na coluna foram de 0,3; 0,8 e 1,2 mL min⁻¹.

III.8.2.- Uso de condições agressivas

Algumas colunas comerciais foram testadas a 60 °C, além de utilizar uma fase móvel alcalina para o teste de estabilidade. A fase móvel alcalina de teste foi preparada

com MeOH/ NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50, v/v). A vazão utilizada foi de 1,2 mL min⁻¹. As características das colunas comerciais são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1.-Características das colunas comerciais usadas nos experimentos preliminares.

Fase estacionária	Tamanho de partícula	Coluna
Rainin-C18	10 µm	145 x 3,9 mm
Rainin-C8	5 µm	125 x 4,0 mm
Hypersil-C18	3 µm	80 x 4,0 mm

Uma outra coluna, preparada no laboratório, com fase estacionária sorvida Davisil (PMOS)-C (150 x 3,9 mm), com tempo de armazenagem de 8 meses, foi também avaliada e seus resultados comparados com as colunas comerciais.

Para avaliar as colunas foi usada como fase móvel MeOH:H₂O (70:30, v/v) a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ e a 60°C. Estas avaliações foram feitas após a passagem de cada 36 mL de fase alcalina, até passar um volume total de ~250 mL. Depois disso, o volume de fase móvel alcalina que passa pela coluna antes de cada avaliação foi aumentado para 72 mL, até o fim do teste (degradação total da coluna).

III.8.3.- Efeito do pH

Para este estudo utilizaram-se colunas com fase estacionária de Davisil (PMOS)-D e E (armazenadas durante 5 e 1 mês, respectivamente). Os testes foram feitos para valores de pH de 8,4 e 9,2 e comparados com o teste do item III.8.2, onde utilizou-se pH 10,1.

As fases móveis básicas foram preparadas de igual forma que no item anterior, com a diferença que para obter o pH 8,4 não foi necessário adicionar hidróxido de sódio. As condições do teste e de avaliação também foram as mesmas.

III.8.4.- Efeito da vazão da fase móvel alcalina

Além do estudo do efeito do pH 8,4 com uma coluna Davisil (PMOS)-D, utilizando uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$, avaliou-se uma coluna similar, Davisil (PMOS)-F, após a passagem do mesmo volume de fase móvel alcalina a uma vazão menor ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$).

III.8.5.- Efeito da fase móvel na avaliação da coluna

Em testes de estabilidade reportados na literatura^{35, 61, 63, 67} as colunas são avaliadas em fase móvel neutra, sendo necessário trocar cada vez a fase móvel teste pela fase móvel neutra.

Com a idéia de saber se a fase móvel utilizada para fazer as avaliações influencia o comportamento da coluna durante a sua degradação, fizeram-se avaliações na mesma fase móvel teste. Estas avaliações foram realizadas após a passagem de volumes de fase alcalina similares ao utilizado quando avaliadas as colunas em fase móvel neutra.

Para este teste foram utilizadas duas colunas, uma Davisil (PMOS)-G com a fase líquida sorvida nos poros ($150 \times 3,9 \text{ mm}$) e uma coluna comercial de Hypersil ODS com fase quimicamente ligada ($40 \times 4,0 \text{ mm}$). Ambas as colunas já tinham sido avaliadas em fase móvel neutra de MeOH/H₂O (70:30), a $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e 60°C (item III.8.2).

A fase móvel alcalina utilizada tanto como fase móvel teste quanto a de avaliação foi MeOH/NaHCO₃ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaOH, pH 10 (50:50), a uma vazão de 1 mL min^{-1} e a 60°C . A mistura teste foi injetada diretamente na fase móvel teste a cada 30 minutos, que equivalem à passagem de 30 mL desta fase.

III.9. Comportamento da coluna de sílica zirconizada com o pH

Estudou-se a estabilidade química de fases estacionárias, baseadas em sílica zirconizada com PMOS imobilizado, que outros testes indicam ser mais resistentes em altos pH. Fases móveis a pH 8,6; 9,2; 10,0 e 11,0 foram preparadas nas mesmas condições anteriores. A temperatura foi de 60°C e utilizou-se uma vazão de

1,2 mL min⁻¹. A coluna foi avaliada em fase móvel neutra a cada 60 minutos, tendo para cada valor de pH quatro pontos de avaliação.

III.10.- Procedimento de avaliação para colunas de fase reversa

Tendo em conta os resultados obtidos escolheram-se determinadas condições para estabelecer um método que permita avaliar colunas contendo fase reversa de forma rápida e eficiente.

Para este teste foram utilizadas como colunas comerciais, a Hypersil ODS e a Novapak, que apresentam uma alta estabilidade química⁶⁷ e uma coluna preparada com a fase de Davisil Zr-(PMOS). Para as três colunas os testes foram feitos em duplicata. O comprimento e diâmetro das colunas variaram dependendo das disponibilidades. As características das colunas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Características das colunas utilizadas no novo procedimento de avaliação da estabilidade.

Fase estacionária	Características das colunas (l x d.i)	
Hypersil ODS-C18, (3 µm)	80 x 4,0 mm	40 x 4,0 mm
Novapak-C18, (4 µm)	60 x 4,0 mm	60 x 4,0 mm
Davisil Zr-(PMOS), (10 µm)	150 x 3,9 mm	80 x 4,0 mm

As condições utilizadas neste procedimento de avaliação da estabilidade de fases reversas foram: uma fase móvel alcalina a pH 10, preparada como no item III.8.2, temperatura de 60°C e uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. As avaliações da coluna foram feitas a cada 30 minutos na mesma fase móvel teste.

III.10.1. - Caracterização física das fases estacionárias

As fases estacionárias das colunas de Novapak C18, Davisil Zr-(PMOS) e Hypersil ODS, testadas através do novo procedimento de avaliação da estabilidade,

foram caracterizadas por Análise Elementar de Carbono e por Microscopia Eletrônica de Varredura.

As colunas foram esvaziadas de maneira que o recheio saísse completamente e de maneira uniforme para tomar porções de diferentes partes (entrada, meio e saída, relativas à posição ocupada pelo recheio na coluna) e, posteriormente, foram caracterizadas pelos métodos físicos. As fases iniciais (antes de encher a coluna) também foram caracterizadas por estes mesmos métodos.

III.10.1.1. - Análise Elementar de Carbono

Esta técnica tem como objetivo avaliar o teor de resíduo de carbono nos suportes, neste caso, a quantidade de carbono presente antes e depois do teste de estabilidade.

O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO₂, que é, então, medido em função da sua condutividade térmica. O aparelho utilizado foi um analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400.

III.10.1.2.- Microscopia Eletrônica de Varredura

As colunas Novapak C18 e Davisil Zr-(PMOS) foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Através desta técnica pode-se observar a forma das partículas do suporte, as características da sua superfície e a distribuição do tamanho das partículas.

A preparação da amostra consistiu em recobri-la com uma fina camada de ouro (100 Å), onde o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo. O equipamento utilizado foi um Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão assistida por campo (FEG-SEM JSM-6330F) do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. A distribuição do tamanho das partículas foi obtida a partir dos diâmetros das mesmas medidos nas imagens feitas no SEM. No caso da coluna Davisil Zr-(PMOS), que possui formas irregulares, tomou-se o maior diâmetro de cada partícula.

Como magnitude representativa da quantidade de partículas por diâmetro foi utilizada a frequência percentual da contagem dada pela expressão:

$$\text{Frequência} = N_i \times 100 / N_T$$

onde: N_i = número de partículas com diâmetro compreendido entre d_i e $d_i + \Delta d$

N_T = número total de partículas medidas

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1.-Parâmetros avaliados para testes de estabilidade

IV.1.1.- Efeito da temperatura

Para estudar o comportamento da coluna com o aumento progressivo da temperatura utilizaram-se duas colunas (A e B) preparadas com a mesma fase estacionária, sílica Davisil com PMOS sorvido, sendo avaliadas cromatograficamente através dos parâmetros N/m , k e A_s , calculados para o pico do naftaleno. Este comportamento é mostrado nas Figuras 5 e 6.

Como pode-se observar, na coluna A, com o aumento da temperatura de 23°C para 30°C, a eficiência apresentou uma queda inicial acentuada de 26000 até 17000 pratos/metros e uma segunda queda aos 13000 mL. A queda inicial tem sido observada em experimentos reportados anteriormente com este tipo de fase utilizando temperatura constante^{34, 78}, razão pela qual pensa-se que este efeito não está relacionado com a temperatura. Os valores de assimetria mostraram um ligeiro aumento aos 3000 mL que acompanha a queda de eficiência. Depois dos 12000 mL a assimetria manteve-se perto de 1,0. O fator de retenção mostrou um decréscimo inicial, o qual indica uma possível perda de PMOS ou um rearranjo do leito cromatográfico que afetou irreversivelmente a qualidade da coluna, mantendo-se depois quase constante para valores de k de 3,6. O teste terminou após a passagem de ~19000 mL, pois os valores de eficiência eram muito baixos. A rápida degradação desta coluna deve-se ao pouco tempo que ficou armazenada a fase estacionária antes de recheiar a coluna (9 dias). Isto indica que é preciso de mais tempo para que o polímero fique mais fortemente sorvido na sílica.

Na coluna B, preparada com uma fase estacionária com maior tempo de armazenagem (dois meses), aconteceu o contrário: observou-se um aumento da eficiência quando houve elevação de temperatura de 21 para 30°C. Após 8000 mL houve uma queda abrupta de 31000 para 23000 pratos/metros. A diminuição posterior da eficiência aconteceu de maneira lenta quando a temperatura foi aumentada para 40, 50 e 60°C, com uma variação de apenas 5000 pratos/metros após a passagem de 46000 mL. Os valores de assimetria mantiveram-se perto de 1,0 com poucas variações. O fator de retenção teve um perfil parecido com o gráfico de eficiência. Devido à pouca variação de todos os parâmetros após 54000 mL, decidiu-se parar o teste.

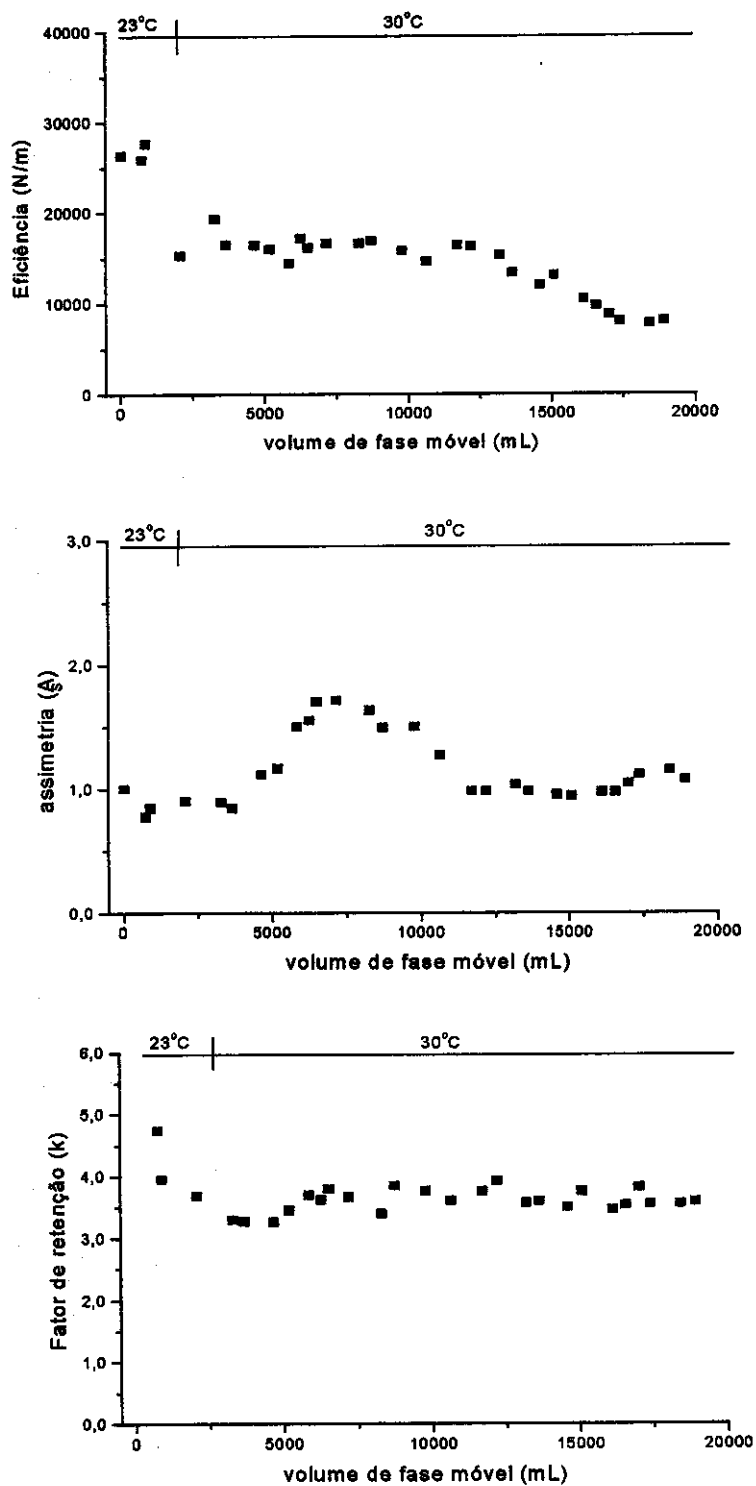


Figura 5.- Efeito da temperatura no desempenho da coluna Davisil (PMOS)-A. Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H₂O (60:40), vazão de teste e avaliação: 1,2 mL min⁻¹ e 0,3 mL min⁻¹, respectivamente. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.

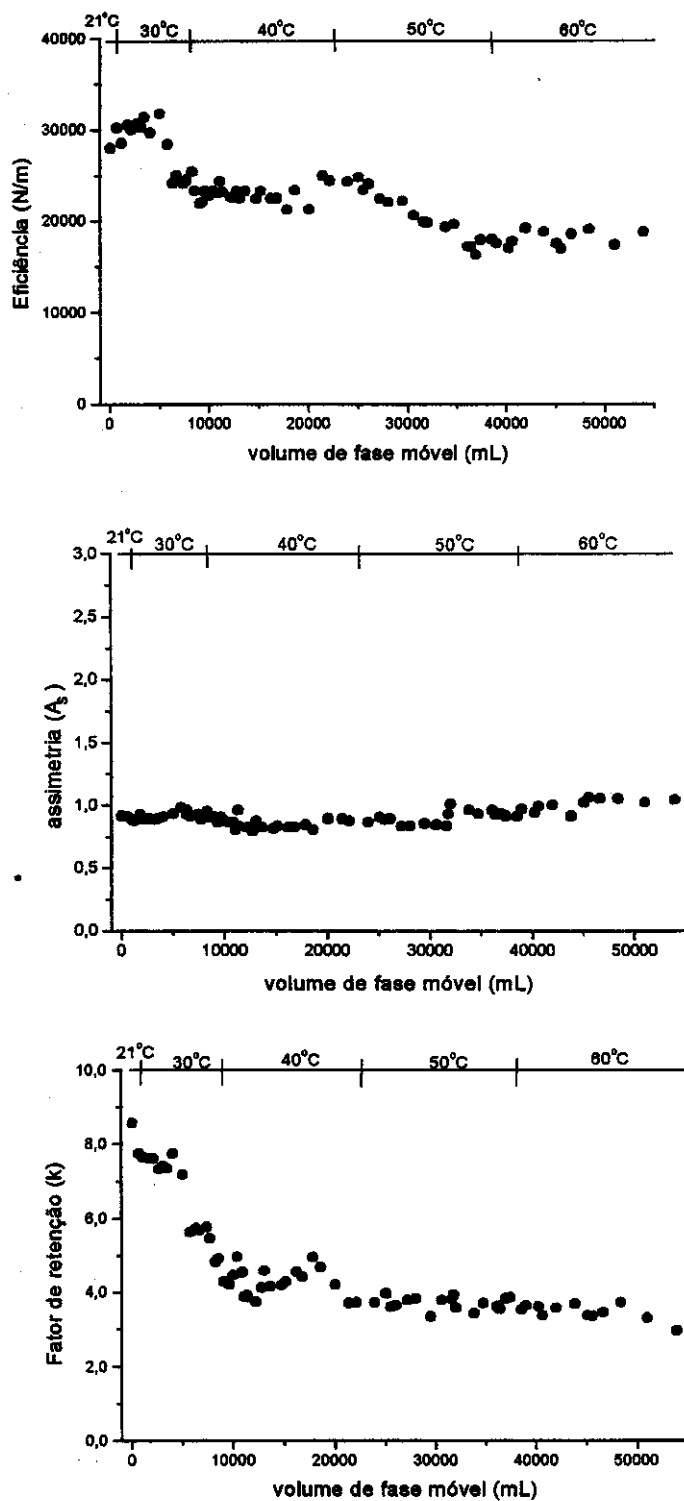


Figura 6.- Efeito da temperatura no desempenho da coluna Davisil (PMOS)-B. Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H₂O (60:40), vazão de teste e avaliação: 1,2 mL min⁻¹ e 0,3 mL min⁻¹, respectivamente. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.

O comportamento da coluna B sugere que altas temperaturas não provocam mudanças tão drásticas na coluna se estiverem sendo usadas fases móveis neutras. A fase estacionária envelhecida antes do enchimento suporta mais de 54 L de fase móvel, mantendo as boas características cromatográficas da coluna.

Fazendo-se uma comparação entre as colunas A e B, pode-se notar através dos dados cromatográficos (Tabela 3) que ambas apresentaram valores iniciais de eficiência e assimetria similares, enquanto que o fator de retenção é quase o dobro para a coluna B. Isto confirma que quanto maior for o tempo transcorrido entre a preparação da fase estacionária e o enchimento da coluna, maior será a quantidade de polímero retido na sílica. Este resultado também foi observado em outro trabalho⁸⁰ no qual a adsorção do polissiloxano na sílica foi um processo lento à temperatura ambiente. Após 3 semanas de preparação da fase estacionária, a quantidade adsorvida aumentou em até 3 vezes.

Tabela 3.- Parâmetros cromatográficos antes e após os testes de estabilidade para ambas colunas. Calculados para o naftaleno.

Coluna	N/m		As		k	
	antes	após	antes	após	antes	após
A	26274	8025	1,0	1,1	4,7	3,6
B	27881	18709	0,9	1,0	8,6	3,3

Neste teste ambas colunas foram avaliadas a diferentes vazões com o objetivo de saber em qual vazão é melhor observado o comportamento cromatográfico da coluna com o aumento da temperatura. Na Figura 7 aparece a coluna B avaliada com vazões de 0,3; 0,8 e 1,2 mL min⁻¹, onde pode-se observar que, para a vazão de 0,3 mL min⁻¹, a coluna apresentou valores de eficiência maiores, de acordo com a curva de Van Deemter⁸¹. Além disso, a esta vazão é observada uma queda um pouco mais acentuada ao redor dos 8000 mL. Entretanto, pode-se dizer que o comportamento em todos os casos é bem similar, como pode ser observado nos valores de eficiência relativa mostrados na Figura 7b, podendo ser apropriada qualquer vazão para o teste de estabilidade.

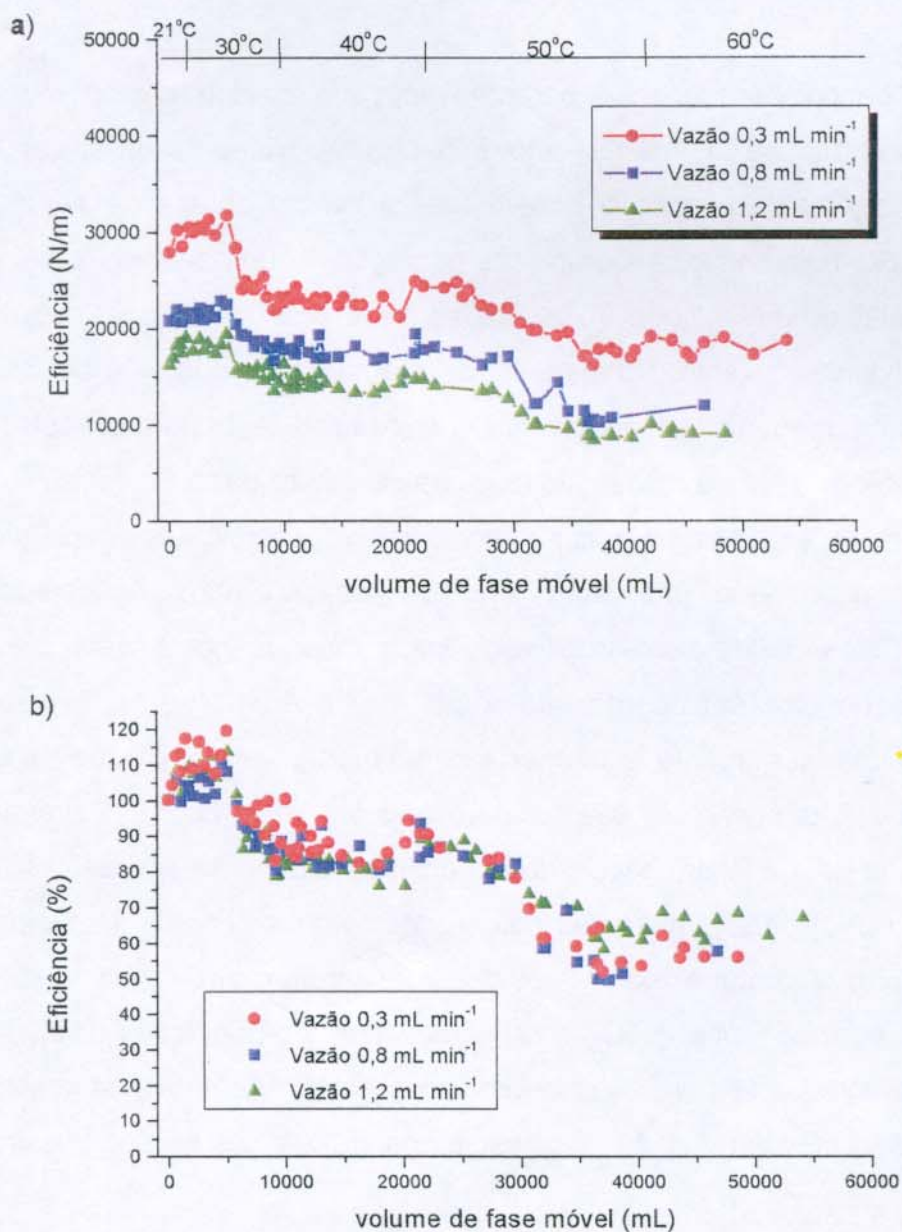


Figura 7.- Eficiência da coluna Davisil (PMOS)-B utilizando diferentes vazões da fase móvel. Fase móvel para teste e avaliação: MeOH:H₂O (60:40), vazão de teste: 1,2 mL min⁻¹. Os parâmetros foram calculados para o pico do naftaleno.

IV.1.2.- Uso de condições agressivas

Devido à pouca variação nas características da coluna com a mudança de temperatura quando foi usada uma fase móvel neutra, decidiu-se estabelecer um limite superior nas condições de avaliação para o qual a coluna apresentasse uma rápida degradação e, com base nisto, encontrar as condições intermediárias para as quais possa ser estabelecido um método de avaliação mais econômico, com uso de menor quantidade possível de solvente. No teste inicial foram usados uns 54 L de fase móvel, que representa uma quantidade muito grande, além de requisitar 94 dias úteis, à 8 h de trabalho/dia (~4 meses) para a realização do teste de estabilidade.

Na literatura⁶⁷⁻⁷¹ encontra-se o uso combinado de fases móveis em pH alcalinos e temperaturas elevadas, que produzem uma degradação mais rápida da coluna cromatográfica. Estes testes de estabilidade para colunas comerciais utilizam, na maioria, fases móveis alcalinas no intervalo de pH 7 a 11. A valores de pH maiores que 8 os testes são feitos, geralmente, a temperatura ambiente, enquanto que para valores de pH entre 7 e 8 a temperatura usada como máximo é de 60 °C. Levando-se em consideração estes dados foram escolhidas condições altamente agressivas (pH 10 e temperaturas de 60°C) para avaliar três colunas comerciais (Tabela 1) e uma coluna produzida no próprio laboratório. Nos testes descritos na literatura^{66-68, 70, 73} são usados grandes volumes de fase móvel (~65 L), enquanto que nas condições utilizadas neste trabalho, colunas como a Hypersil são degradadas em um tempo menor com menor quantidade de fase móvel (~1,1 L). Os resultados destes testes são mostrados na Figura 8.

Pode ser observado através dos gráficos que as colunas Hypersil ODS de 3 µm e Rainin C8 de 5 µm apresentam um patamar das melhores condições de análise e a posterior queda na eficiência em relação as outras duas colunas nas mesmas condições. A falta de um patamar para a coluna Davisil (PMOS) indica que sua degradação ocorreu logo no início do teste. Para a coluna Rainin C18 a eficiência apresentou uma oscilação inicial, mas a sua degradação começou logo após a passagem de 180 mL de fase alcalina.

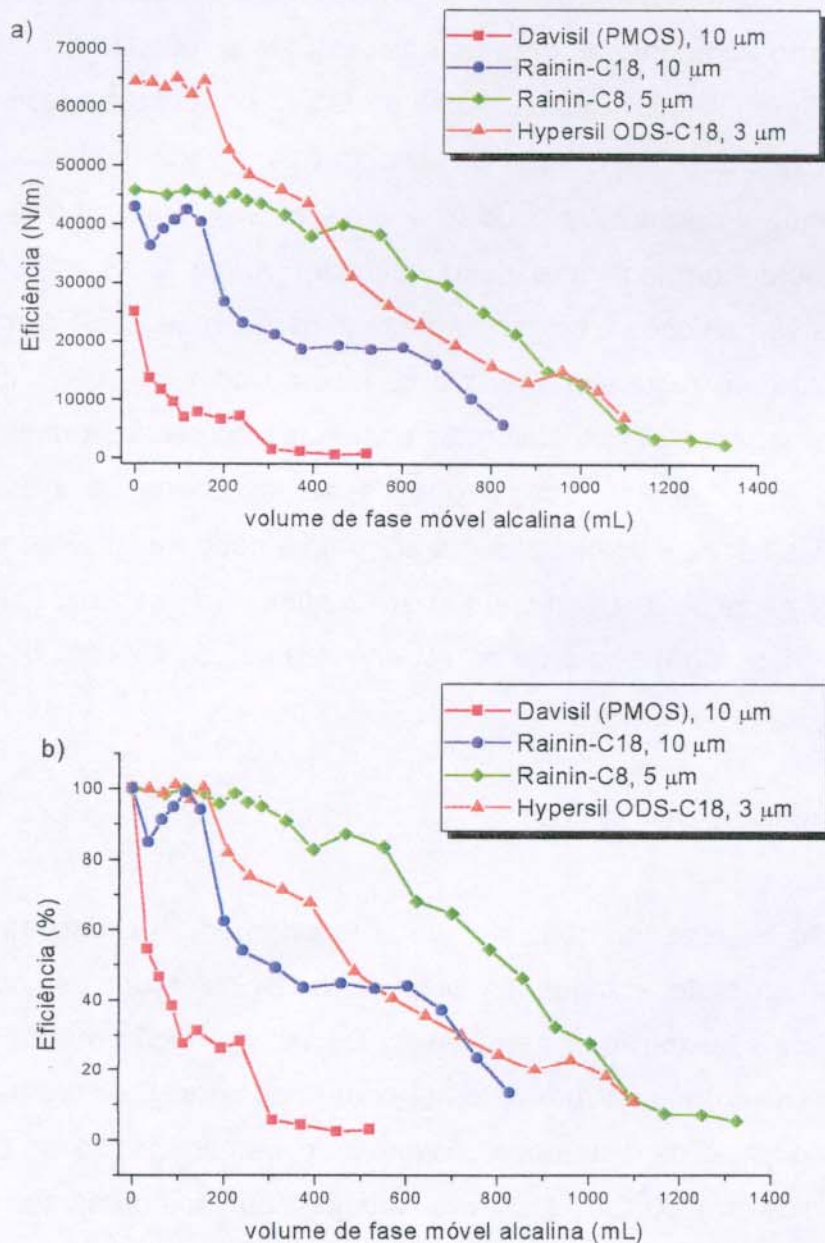


Figura 8.- Comparação da estabilidade de algumas colunas comerciais com a coluna Davisil (PMOS)-C a pH 10,1 e 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50), vazão: 1,2 mL min⁻¹. Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H₂O (70:30), vazão: 0,3 mL min⁻¹.

Na Figura 8b foram expressas as eficiências relativas de cada coluna para visualizar melhor o comportamento geral das mesmas a respeito à eficiência inicial. O fato da coluna Davisil (PMOS) estar menos protegida por conter a fase líquida sorvida, sem ligações covalentes com o suporte, fez com que a sílica desta coluna dissolvesse mais rapidamente. A coluna Rainin C8 foi a mais estável. Por outro lado, observou-se um comportamento intermediário para as colunas Hypersil ODS e Rainin C18, ambas com cadeias de 18 carbonos e contendo porcentagens similares de carbono, 12 e 11 % respectivamente. Este resultado está em desacordo com os reportados na literatura onde fases estacionárias de cadeias mais compridas apresentam maior estabilidade^{11, 72}. O resultado no presente trabalho poderia ser explicado considerando-se que a orientação destas cadeias com respeito à superfície pode ser aleatória, o que faz que ocupe um maior espaço na superfície. Porém, o número de cadeias ligadas ao suporte pode ser menor, ficando maior área da superfície da sílica exposta ao ataque da fase móvel.

IV.1.3 - Efeito do pH

Como não foi possível observar um comportamento de degradação da coluna Davisil (PMOS) no teste anterior, foi preciso desenvolver um estudo em busca de diferentes pH (mais baixos) que permitissem uma degradação menos drástica. Desta forma, seria possível observar um patamar com boas condições cromatográficas, mas ainda com pouco gasto de fase móvel. Assim, os pH estudados foram 8,4 e 9,2, com a temperatura fixada em 60°C. As curvas obtidas são mostradas na Figura 9, onde também são incluídos os dados do comportamento deste tipo de coluna a pH 10,1, que foi descrito no item anterior. Para valores de pH menores (8,4 e 9,2) a degradação da coluna é mais lenta, podendo-se observar no caso do pH 8,4 a existência de um patamar para o qual a coluna apresenta os melhores valores de eficiência e assimetria. Neste caso, é possível acompanhar a evolução da coluna até o momento em que começa a mudar abruptamente a eficiência e a assimetria dos picos com o uso de apenas 570 mL.

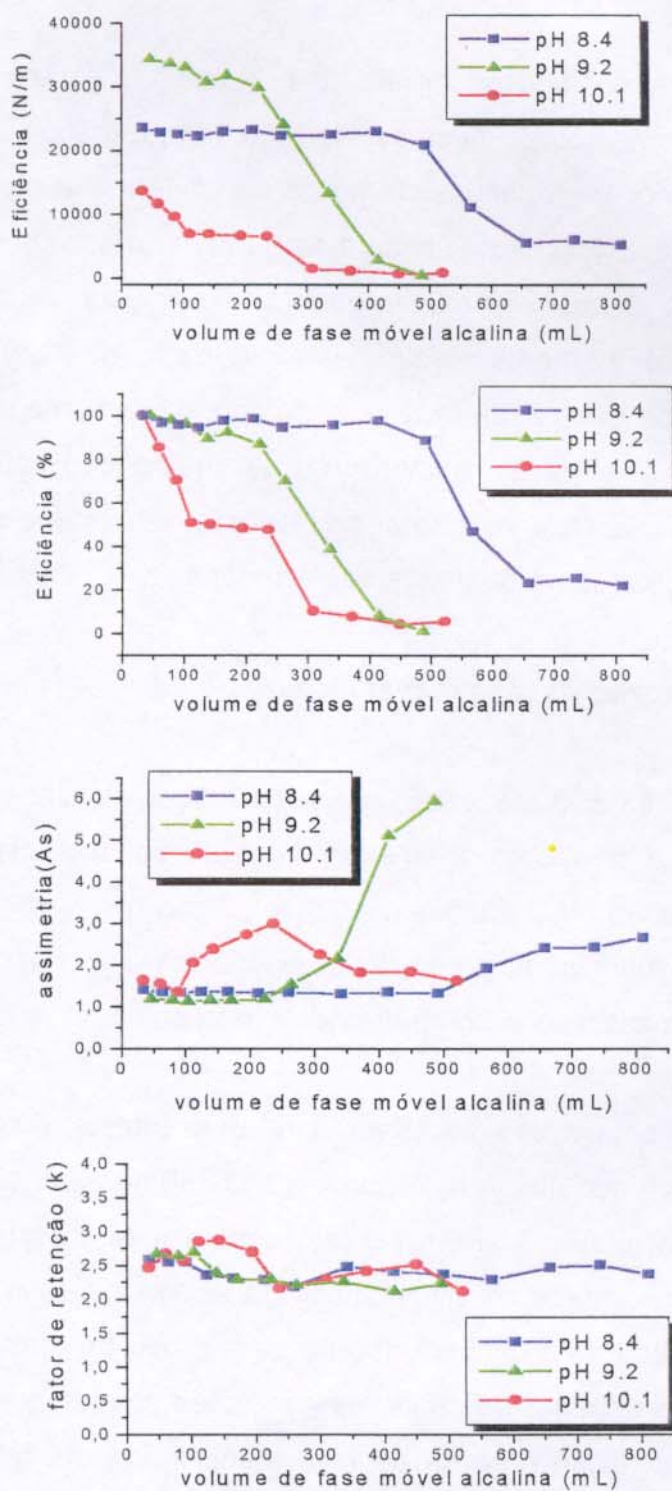


Figura 9.-Efeito do pH na estabilidade de colunas Davisil (PMOS)-C, D e E à temperatura de 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH, com pH variado (50:50), dvazão: 1,2 mL min⁻¹ Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H₂O (70:30), vazão: 0,3 mL min⁻¹.

As diferenças nas eficiências iniciais das 3 colunas foram devidas à não reprodutibilidade no enchimento das mesmas. Na Figura 9, no gráfico de eficiência (%), é possível observar melhor a magnitude de perda da eficiência a medida que a fase alcalina passa através da coluna. Aqui observa-se que com o uso de fase móvel a pH 9,2 a eficiência caiu 12 % aos 240 mL, enquanto que depois de passar o mesmo volume no teste usando pH 10,1 o decréscimo da eficiência foi de 52 %.

É importante notar que, à medida que aumenta o volume de fase alcalina passando através da coluna, há um aumento da assimetria que está correlacionado com a perda de eficiência. Entretanto, o fator de retenção permanece quase inalterado, o que significa que não ocorreu perda de fase estacionária.

IV.1.4- Efeito da vazão da fase móvel alcalina

Para avaliar a influência da vazão de fase móvel alcalina no processo de degradação, foi comparado o comportamento de duas colunas preparadas com a mesma fase estacionária frente à vazões de 0,6 e 1,2 mL min⁻¹, considerando que o volume de fase alcalina para cada ponto de avaliação fosse o mesmo para as duas colunas. Na Figura 10 mostra-se o comportamento das colunas nestas condições de teste.

Quando foi usada uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ para o teste, a coluna apresentou uma estabilidade menor, tendo uma queda abrupta aos 350 mL. Isto sugere que quanto mais tempo a fase estacionária fica em contato com a mesma quantidade de fase alcalina, maior será a quantidade de sílica dissolvida e menor o tempo para ocorrer a degradação da coluna. Este fato também aponta para o uso de menor quantidade de solvente sem a perda do patamar de melhores condições cromatográficas. Também a esta vazão ocorreu uma possível perda de fase estacionária que não foi observada quando utilizou-se uma vazão de 1,2 mL min⁻¹.

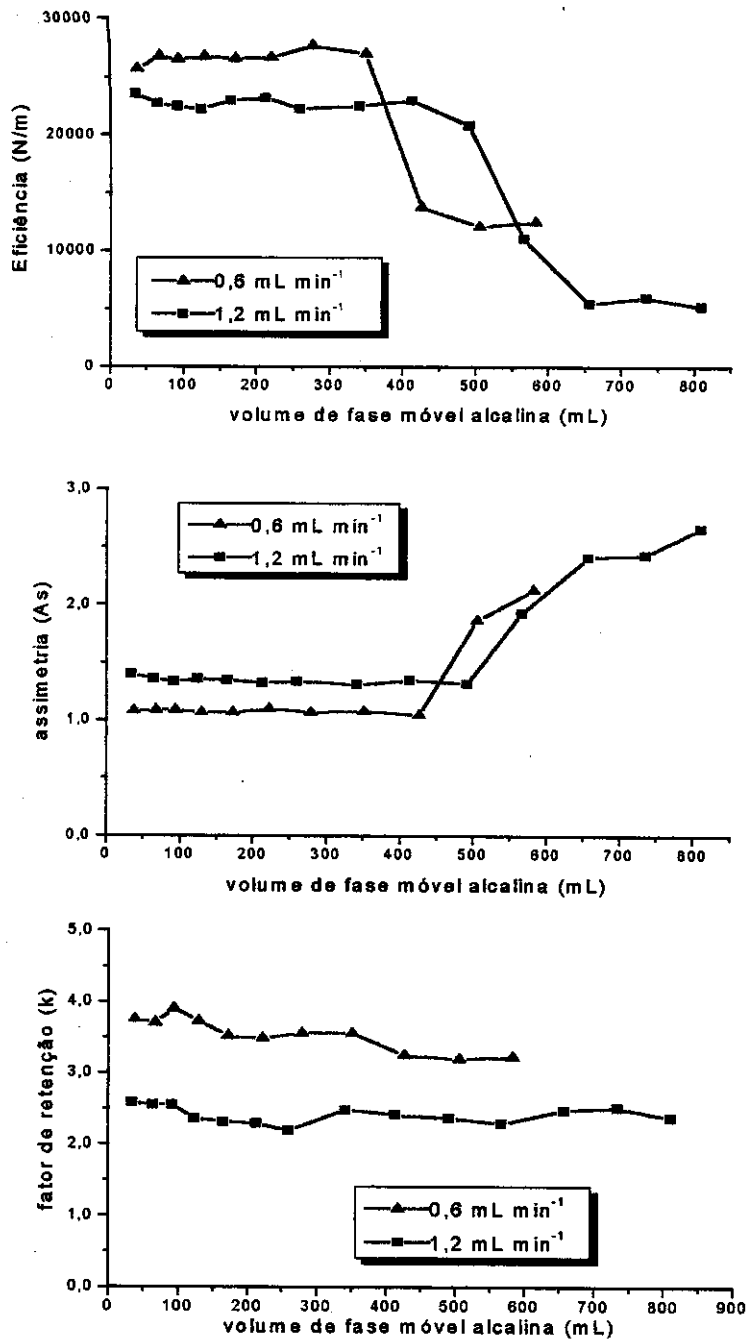


Figura 10.-Efeito da vazão de teste com fase móvel alcalina na estabilidade da coluna Davisil (PMOS)-D e F com temperatura de 60°C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹, pH 8,4 (50:50). Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H₂O (70:30), vazão: 0,3 mL min⁻¹.

IV.1.5 – Efeito da fase móvel na avaliação da coluna

Até o momento, mesmo que os testes de estabilidade fossem feitos em fase móvel alcalina, cada avaliação da coluna foi feita em fase móvel neutra. Para isso, a fase móvel alcalina é trocada pela fase móvel neutra a cada determinado volume de fase teste. Isto foi feito seguindo a metodologia de testes reportados na literatura^{35, 61, 67}. No entanto, esta operação de trocar a fase móvel consome tempo, uma vez que é necessário esperar que a coluna alcance o equilíbrio para então injetar a mistura teste. Por esta razão, decidiu-se fazer as avaliações na mesma fase móvel alcalina. Este procedimento é mais realista, dado que as análises de peptídeos e proteínas são realizadas em fase móvel tamponada.

Comparações do comportamento das colunas Davisil (PMOS) e Hypersil ODS, avaliadas nas duas fases móveis, neutra e alcalina (pH 10) são apresentadas nas Figuras 11 e 12. Observa-se que as colunas mantêm comportamentos de degradação bem similares independentemente da troca ou não da fase móvel alcalina pela fase móvel neutra no momento da avaliação da coluna.

Na coluna Davisil (PMOS), cuja degradação começa logo no início, esta foi um pouco mais acentuada quando não foi trocada a fase alcalina, tendo uma queda de 6 % em relação à fase neutra para um volume de 195 mL de fase móvel teste. Entretanto, na coluna Hypersil ODS acontece o contrário. Quando realizadas as avaliações em fase móvel neutra, a eficiência teve uma queda de 10 % em relação à fase alcalina para ~210 mL de fase móvel teste. Tais diferenças poderiam ocorrer por erros experimentais.

Baseados nestes resultados, verifica-se que a troca ou não da fase teste no momento da avaliação da coluna não fará muita diferença no comportamento da mesma, nem no momento em que será degradada. Portanto, pode-se notar, através destes resultados, outra maneira de reduzir o tempo requerido para fazer o teste de estabilidade, sem que aconteçam mudanças apreciáveis na evolução da coluna durante o estudo da sua degradação.

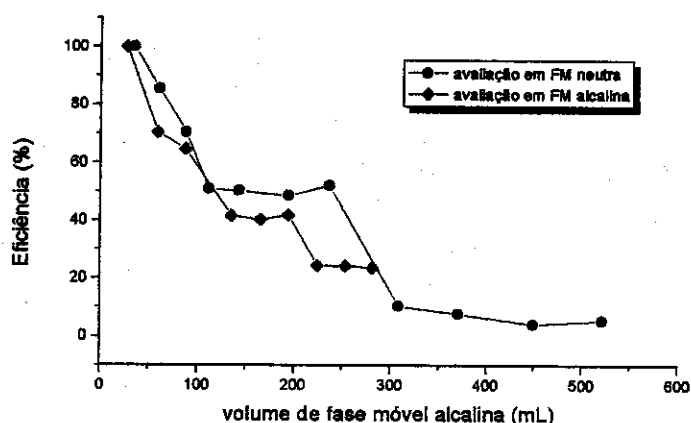


Figura 11.-Avaliação de colunas Davisil (PMOS)-C e G, em fases móveis neutra (MeOH/H₂O (70:30), vazão: 0,3 mL min⁻¹) e alcalina (MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50), vazão: 1,0 mL min⁻¹), durante o teste de estabilidade com fase móvel alcalina.

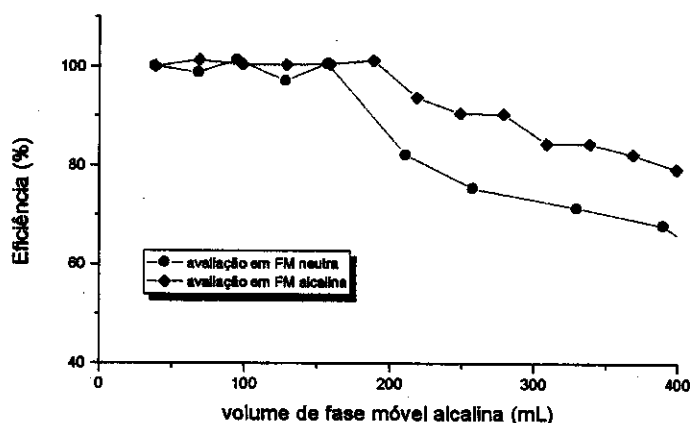


Figura 12.- Avaliação de colunas Hypersil ODS, em fases móveis neutra e alcalina, durante o teste de estabilidade com fase móvel alcalina. Mesmas condições da Figura 11.

Os cromatogramas obtidos das duas colunas, avaliadas com fases móveis neutra ou alcalina, no princípio do teste e após eluído um certo volume de fase teste, são mostrados nas Figuras 13 a 16. A mistura teste utilizada foi composta por: acetona (1), benzonitrila (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5).

Como mostra-se nos cromatogramas das avaliações feitas em fase móvel alcalina (Figuras 14 e 16), a separação dos compostos da mistura teste foi maior, tanto no início como ao final do teste de estabilidade. Este fato pode ser observado em ambas as colunas. A causa deve-se, principalmente, a menor proporção do solvente orgânico na fase móvel alcalina (50%), em relação à fase móvel neutra (70 %), que provocou um maior espaçamento entre os picos. Porém, observa-se uma maior deformação dos picos momentos antes da queda na eficiência, quando são avaliadas as colunas em fase neutra. Isto poderia ser devido à constante troca de fase móvel que afetou o desempenho da coluna.

Para a coluna Davisil (PMOS) avaliada em fase móvel neutra, após a passagem de 195 ml de fase móvel teste (Figura 13), os picos apareceram colapsados e tiveram uma retenção menor que no início do experimento. No caso da coluna de Hypersil ODS (Figura 15), a resolução dos picos ainda era boa poucos momentos antes de começar a cair a eficiência. Os picos só apresentaram um pouco de cauda frontal e mantiveram quase a mesma retenção, o que demonstra a boa estabilidade da coluna. Os parâmetros cromatográficos das colunas são apresentados na Tabela 4.

Segundo a Tabela 4, na coluna Davisil (PMOS) houve um aumento na eficiência, quando usada fase móvel alcalina, como também sofre uma queda maior no fim do teste. A assimetria dos picos aumentou muito mais no fim do teste na fase neutra, indicando a presença de cauda. O incremento do valor de k na fase móvel alcalina sugere que houve um aumento da retenção do naftaleno nesta fase. No fim do teste, k diminuiu ao redor de uma unidade, em ambas fases móveis, o que indica uma possível perda de fase líquida.

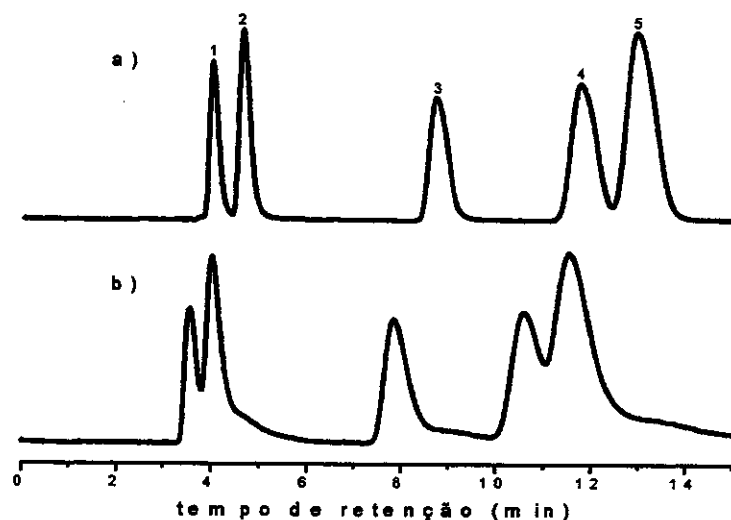


Figura 13. Cromatogramas da coluna Davisil (PMOS)-C avaliada em fase móvel neutra a $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, após a passagem de a) 35 mL e b) 195 mL de fase móvel alcalina.

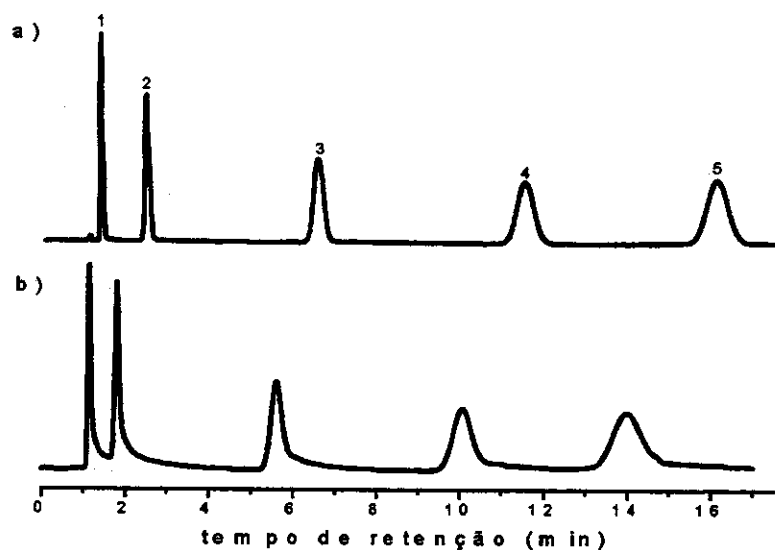


Figura 14. Cromatogramas da coluna Davisil (PMOS)-G avaliada em fase móvel alcalina a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, após a passagem de a) 27 mL e b) 195 mL de fase móvel alcalina.

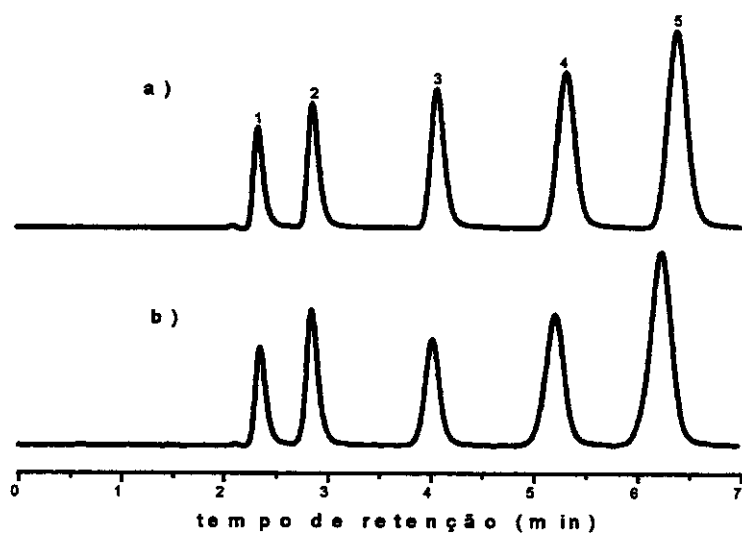


Figura 15. Cromatogramas da coluna Hypersil ODS avaliada em fase móvel neutra a $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, após a passagem de a) 38 mL e b) 211 mL de fase móvel alcalina.

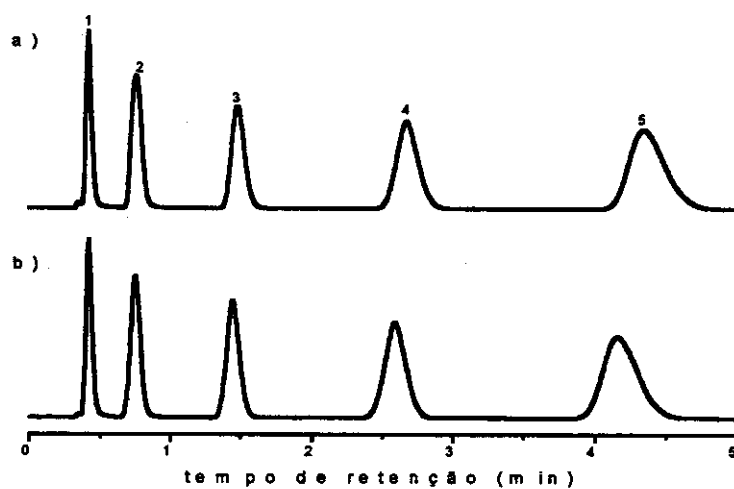


Figura 16. Cromatogramas da coluna Hypersil ODS avaliada em fase móvel alcalina a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, após a passagem de a) 39 mL e b) 219 mL de fase móvel alcalina.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos das colunas Hypersil ODS e Davisil (PMOS), quando avaliadas em fase móvel neutra e alcalina, nas condições mostradas na figura 11 e 12.

Coluna	Fase móvel	Volume de fase teste	Eficiência	Assimetria	Fator de retenção
Davisil (PMOS)	Fase neutra	35 ml	13558	1,6	3,4
		195 mL	6535	2,7	2,7
	Fase alcalina	27 mL	28780	1,1	14,1
		195 mL	11972	1,3	13,5
Hypersil ODS	Fase neutra	38 mL	64031	1,1	2,1
		211 mL	52565	0,9	2,0
	Fase alcalina	39 mL	32662	1,6	11,4
		219 mL	30621	1,5	11,2

No caso da coluna Hypersil ODS, houve um decréscimo na eficiência quando avaliou-se a coluna na fase móvel alcalina, mas sofreu uma queda maior ao final do experimento quando usada fase móvel neutra. Os picos na fase neutra apresentam um pouco de cauda frontal ao final do experimento (0,9 é o limite inferior de assimetria aceita), enquanto na fase alcalina são obtidos picos com uma ligeira cauda (1,6 é o limite superior de assimetria aceita). O fator de retenção também aumenta na fase alcalina, como aconteceu com a coluna Davisil (PMOS), mantendo-se quase inalterado ao final do experimento, para ambas as fases móveis. Isto indica que não ocorreu perda de fase líquida, demonstrando a boa qualidade desta coluna.

IV.2. Comportamento da coluna de sílica zirconizada com o pH

Trabalhos reportados na literatura^{50, 82} mostraram que fases estacionárias de zircônia (ZrO₂) recoberta com fases poliméricas apresentam uma alta estabilidade química e térmica. Isto faz delas um material de muita utilidade em análises onde é preciso trabalhar em faixas de pH maiores do que às permitidas pelas fases estacionárias baseadas em sílica. Porém, estas fases tem como principal desvantagem

a pouca disponibilidade no mercado de tamanhos de partículas e diâmetros de poros. A síntese de fases estacionárias de sílica zirconizada foi uma alternativa para superar esta desvantagem, uma vez que se aproveita as boas qualidades dos suportes de sílica.

A partir de uma fase de sílica zirconizada recoberta com PMOS imobilizado, realizou-se um estudo do seu comportamento a diferentes pH e temperatura de 60°C (Figura 17).

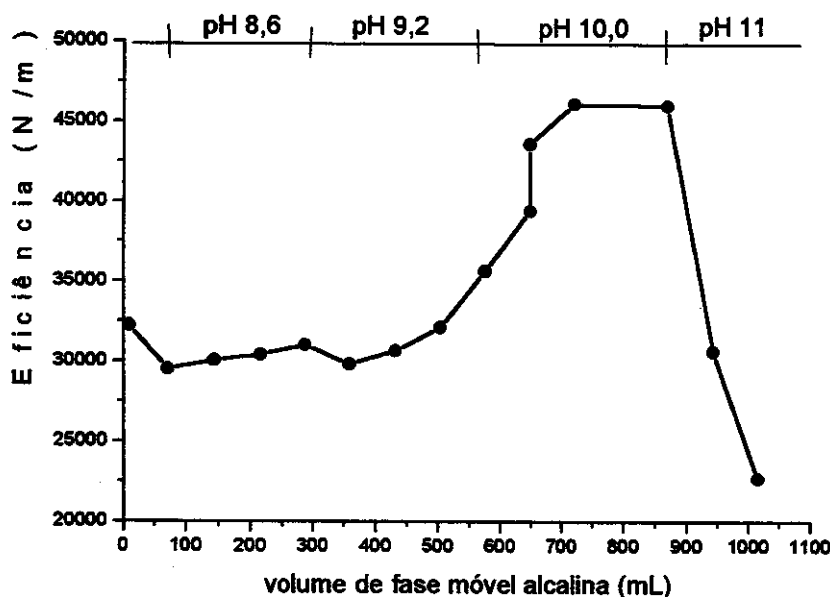


Figura 17. Comportamento da coluna de sílica zirconizada com variação do pH e temperatura de 60 °C. Condições do teste: fase móvel alcalina: MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH (50:50), vazão: 1,2 mL min⁻¹ Condições de avaliação: fase móvel: MeOH/H₂O (70:30), vazão: 0,3 mL min⁻¹.

Observa-se que, apesar do aumento progressivo do pH, mantendo temperatura constante de 60°C, a coluna apresenta melhores valores de eficiências quando o pH é aumentado de pH 8,6 para 10,0, falindo a pH 11. O comportamento destas fases ainda encontra-se em estudo, porém os resultados mostram que elas apresentam estabilidades química e térmica, com boas eficiências após a passagem de 860 mL de fase móvel alcalina.

A evolução da coluna nos diferentes valores de pH é apresentada nos cromatogramas da Figura 18. Pode-se observar que a medida que o pH aumenta de 7 a 10, os picos do naftaleno vão ficando mais estreitos e simétricos. Também os compostos mais polares (acetona e benzonitrila) eluem em todos os casos com tempos similares, devido à pouca solubilidade na fase estacionária, não sendo afetados pelo pH. Entretanto, com o aumento do pH, os outros compostos ficam cada vez menos retidos.

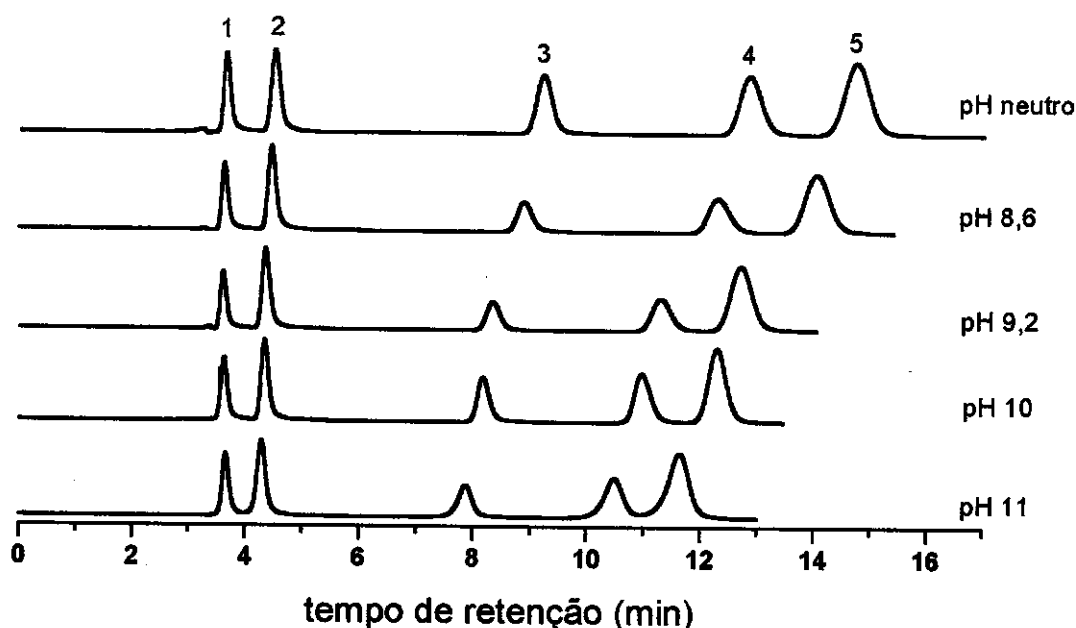


Figura 18. Cromatogramas da coluna de sílica zirconizada em função do pH, avaliadas em fase móvel neutra.

IV.3- Procedimento de avaliação da estabilidade para colunas de fase reversa

Considerando os resultados obtidos, um novo procedimento para determinar a estabilidade relativa de uma fase estacionária foi proposto. Este procedimento consiste no uso de uma fase móvel de pH 8,4 e vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ ou pH 10,1 e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ para ambos os casos. A avaliação do comportamento cromatográfico ocorre na mesma fase móvel teste.

estabilidade⁶⁷ (Hypersil ODS e Novapak C18, ambas com cadeias de 18 carbonos e com tamanhos de partículas de 3 e 4 μm , respectivamente), sendo avaliadas em duplicata, para assim evidenciar a repetibilidade do método. Também foram testadas colunas baseadas em sílica Davisil zirconizada com PMOS imobilizado, preparadas no laboratório. Os resultados estão apresentados na Figura 19.

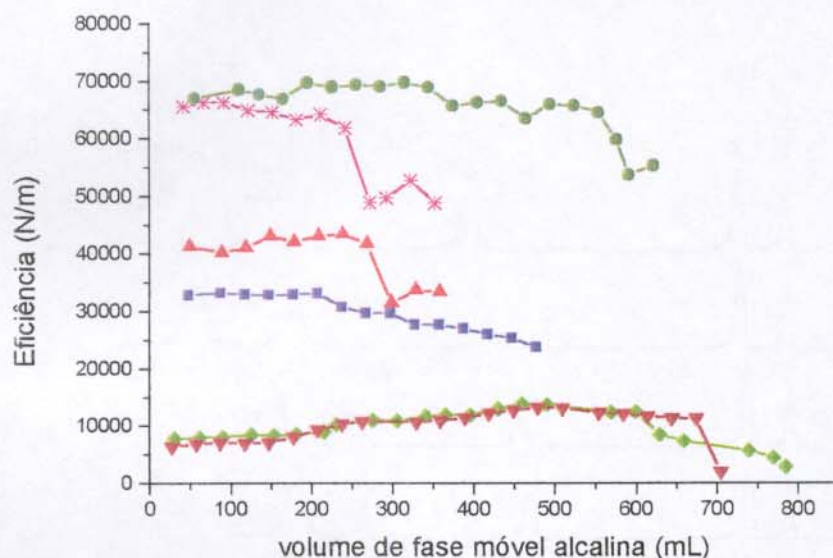


Figura 19. Repetibilidade de colunas testadas pelo novo método. Condições teste: fase móvel alcalina: $\text{MeOH}/\text{NaHCO}_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaOH , pH 10 (50:50), 60°C , a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. As avaliações foram feitas na mesma fase móvel alcalina com a mesma vazão. Hypersil ODS (▲, ■), Davisil Zr-(PMOS) (◆, ▼) e Novapak C18 (*, ●).

Pode-se observar que as colunas comerciais Hypersil ODS e Novapak C18, degradaram em média ao redor dos 250 mL de fase móvel alcalina. Já a coluna de sílica zirconizada mostrou uma estabilidade maior, até ao redor de 650 mL, apesar do suporte de sílica ser do tipo xerogel. Isto evidencia a alta proteção que a zircônia confere a sílica, impedindo a sua rápida dissolução, ainda que em temperaturas elevadas, além do alto pH.

Nas colunas Hypersil ODS e Davisil Zr-(PMOS) os testes mostraram boa repetibilidade, enquanto para a coluna Novapak C18, observou-se comportamentos diferentes, talvez relacionados com os antecedentes da coluna. É interessante ressaltar a repetibilidade das fases zirconizadas, ainda que sendo testadas em colunas de comprimentos diferentes, o que evidencia que este parâmetro não influenciou no estudo de degradação.

Na literatura⁶⁷ a coluna Hypersil ODS teve uma duração de ~7 meses (82 L), enquanto que para a Novapak foi de ~5 meses (57 L). Porém, pelos testes realizados neste trabalho ambas colunas degradaram com volumes de fase alcalina bem próximos. Baseado nestes resultados pode-se concluir que colunas avaliadas por este procedimento, quando degradadas depois da passagem de 250 mL, terão um tempo de vida útil em média superior a 6 meses, em condições de uso mais brandas.

Os cromatogramas das três colunas no início do teste e depois da passagem de um determinado volume de fase móvel estão apresentados nas Figuras 20 a 22. Pode-se observar através dos cromatogramas que momentos antes da degradação das colunas, todas apresentavam picos resolvidos e com boas eficiências.

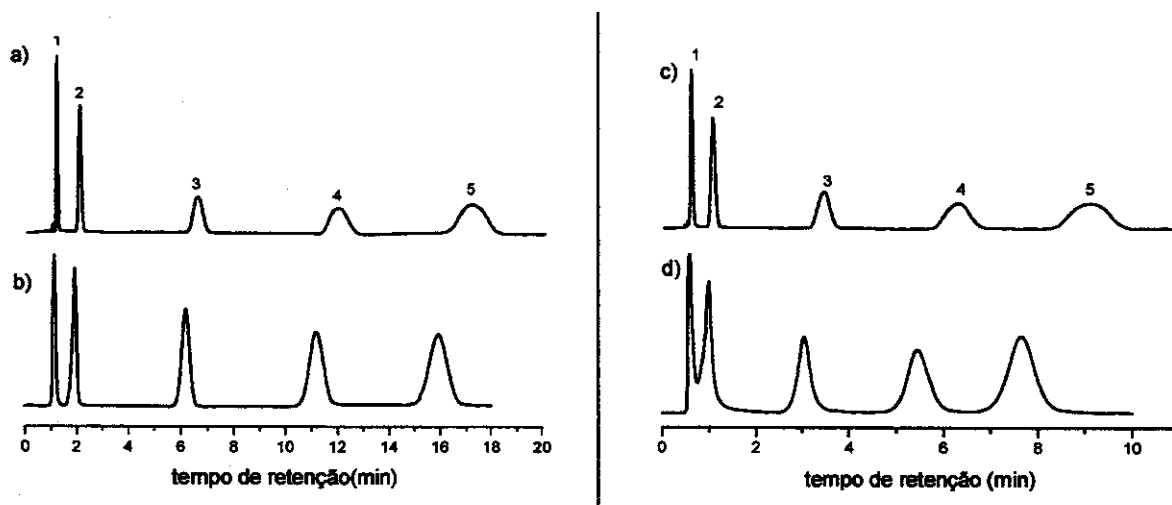


Figura 20.- Cromatogramas das colunas de Davisil Zr-(PMOS) no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade. Coluna 1 (a, b) e Coluna 2 (c, d).

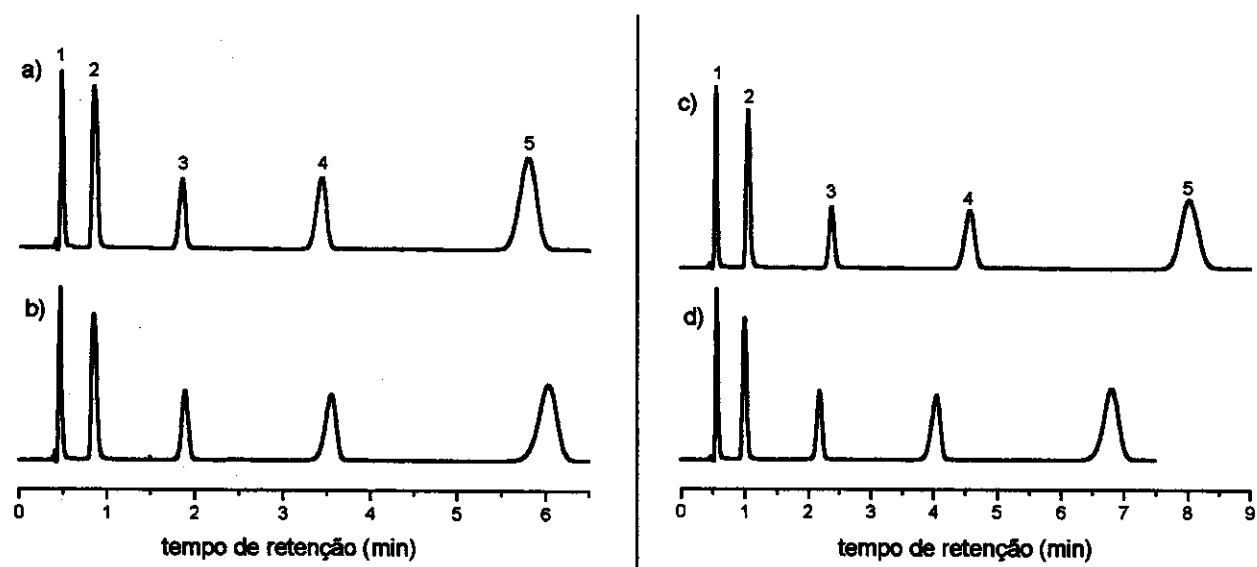


Figura.21.- Cromatogramas das colunas de Novapak-C18 no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade. Coluna 1 (a, b) e Coluna 2 (c, d).

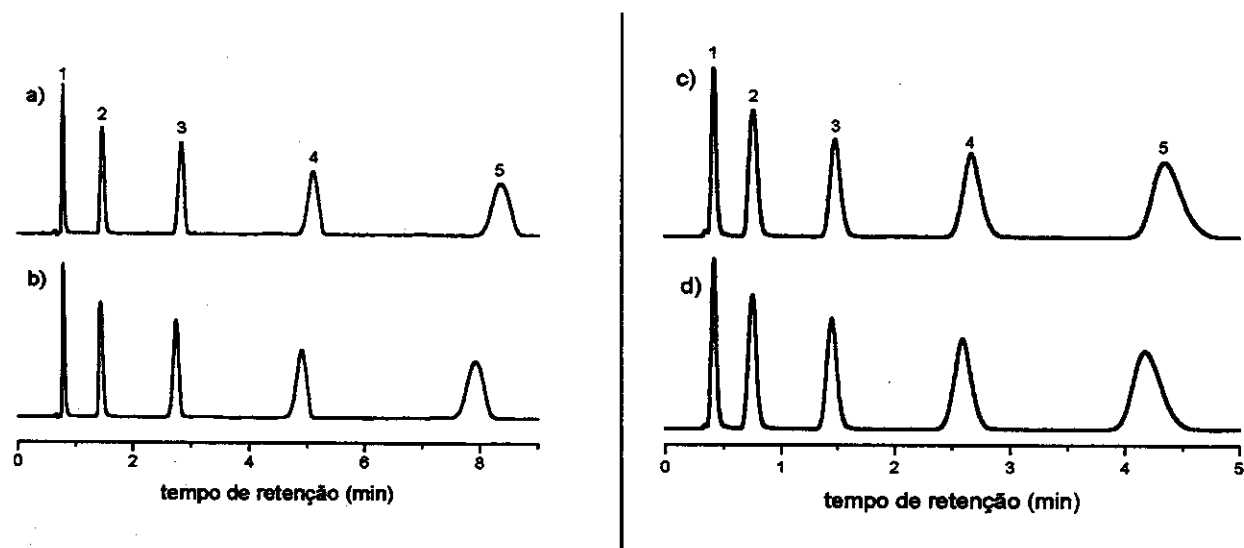


Figura 22.- Cromatogramas das colunas de Hypersil ODS no início a), c) e final b), d) do teste de estabilidade. Coluna 1 (a, b) e Coluna 2 (c, d).

IV.3.1 Caracterização física das fases estacionárias

Para se ter uma idéia do que acontece dentro da coluna cromatográfica depois de seu uso contínuo, foram feitos testes físicos em partes diferentes das colunas estudadas pelo novo procedimento.

IV.3.1.1. Análise Elementar de Carbono

Na Tabela 5 aparecem os resultados das porcentagens de carbono obtidas com as colunas Novapak-C18, Davisil Zr-(PMOS) e Hypersil ODS no início (antes do enchimento da coluna) e no fim do teste de estabilidade, utilizando o novo procedimento de avaliação da estabilidade proposto neste trabalho.

Tabela 5. Porcentagem de carbono (% C) presente nas fases estacionárias testadas pelo novo procedimento, antes e depois de degradadas.

Fase estacionária	Novapak-C18	Davisil Zr-(PMOS)	Hypersil ODS
Inicial ^a	8,21	19,30	11,08
Entrada da coluna ^b	7,65	24,07	-
Meio da coluna ^b	7,83	18,43	-
Saída da coluna ^b	8,10	18,22	-
Final ^b	-	-	11,53

^a: antes do teste de estabilidade

^b: depois do teste de estabilidade

Segundo mostram os resultados da Tabela 5 a coluna de Novapak-C18, depois do teste de estabilidade, mostrou um ligeiro decréscimo na % C na entrada e no meio da coluna, em relação a fase inicial. Por sua vez, dentro da coluna observou-se um aumento da % C na saída da coluna cromatográfica. Este resultado coincide com o obtido por Kirkland⁶⁷, que pode ser explicado por um possível arraste da fase ligada da entrada da coluna a medida que a sílica começa a dissolver-se, ficando presa na saída da coluna.

Para a coluna de Davisil Zr-(PMOS) observou-se um comportamento diferente, no qual a % C no topo da coluna é maior que na fase inicial e do que no resto da coluna (meio e fim). O motivo deste aumento deve-se à configuração da fase líquida que, neste caso, encontra-se imobilizada por entrecruzamento das cadeias poliméricas. Quando a sílica é dissolvida, esta consegue rearranjar-se sem ser arrastada. A razão polímero/sílica irá fornecer um valor maior do % C, uma vez que a densidade da partícula do suporte diminui, mantendo-se a mesma quantidade de fase ligada ⁶⁷.

No caso da coluna Hypersil ODS o valor do % C na fase final não teve muita variação comparado com a fase inicial, o que indica que não houve perda da fase ligada, como também aconteceu com as colunas Novapak-C18 e Davisil Zr-(PMOS).

IV.3.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 23 estão apresentadas as imagens das fases estacionárias iniciais (antes do enchimento da coluna) para as colunas Novapak C18 e Davisil Zr-(PMOS). Observa-se que na coluna Novapak C18 (Figura 23 a) as partículas tem forma esférica e a dispersão dos tamanhos é pequena, enquanto na Davisil Zr-(PMOS) (Figura 23 b) as partículas têm formas irregulares com uma maior dispersão de tamanhos.

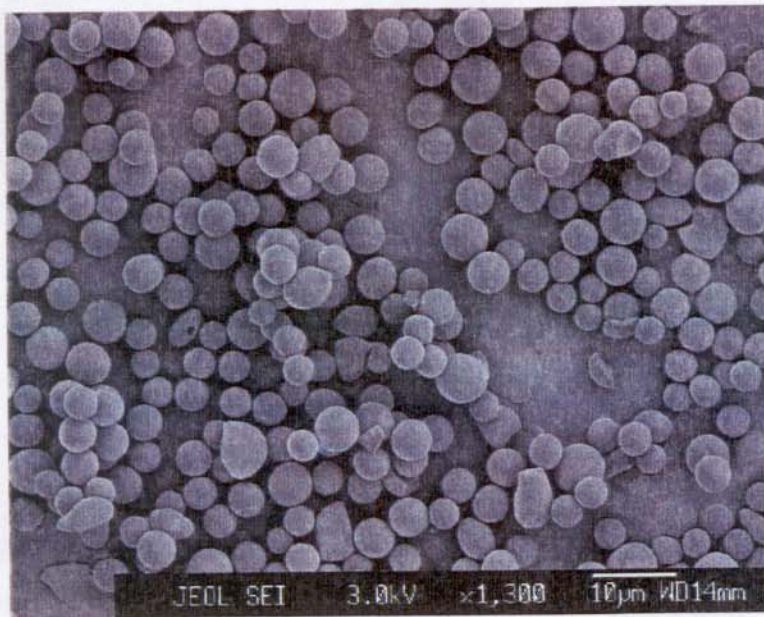
A Figura 24 corresponde à coluna Novapak após a degradação. Aparentemente não se observam mudanças na distribuição e forma das partículas da fase estacionária, dentro da coluna (entrada, meio e saída), comparadas com a fase inicial (Figura 23 a). No entanto, nas distribuições de tamanho de partículas mostradas na Figura 25 pode-se observar um pequeno deslocamento desta distribuição para diâmetros menores no final do teste de estabilidade, comparado com a distribuição inicial. Porém, ao longo da coluna não existem diferenças apreciáveis, indicando que a dissolução das partículas de sílica aconteceu de forma similar em todas as partes (entrada, meio e saída).

No caso da coluna Davisil Zr -(PMOS) as formas das partículas ao longo da coluna, após a sua degradação (Figura 26) apresentam diferenças notáveis. Observam-se rachaduras na superfície das partículas do meio e saída da coluna, enquanto que na entrada as partículas são menores e não apresentam rachaduras. Imagens ampliadas da fase inicial e do meio da coluna (Figura 27a e 27b, respectivamente), mostram que também existem rachaduras na fase inicial e com a mesma forma. A sílica não

apresenta estes problemas em sua forma pura, segundo imagens do MEV obtidas em trabalhos anteriores⁷⁹, sugerindo que as rachaduras não são formadas durante a degradação, mas durante a reação da sílica com o alcóóxido de zircônio. É importante ressaltar que a maior parte das rachaduras foi observada principalmente nas partículas maiores.

Nos gráficos das distribuições de tamanho de partículas para a coluna Davisil Zr- (PMOS) (Figura 28) pode-se observar uma similaridade na distribuição entre a saída da coluna e a fase inicial, enquanto no meio e na entrada da coluna, a distribuição se desloca para diâmetros de partículas menores. Este deslocamento mais acentuado na entrada da coluna sugere que a dissolução da sílica ocorre de forma diferente ao longo da coluna. O fato de não existirem rachaduras nas partículas da entrada da coluna sugere que a diminuição da quantidade de partículas com diâmetros grandes (entre 15 e 25 μm) e o aumento na região entre 5 e 10 μm pode ser devido a possíveis quebras decorrentes das rachaduras. Além disso, estas quebras ocorrem no interior das rachaduras e não na superfície da partícula onde o polímero imobilizado garante uma melhor proteção. Isto está em concordância com os resultados obtidos nos testes de porcentagem de carbono, onde se observou que a porcentagem relativa de carbono na entrada da coluna é maior que no restante dela. Esta diminuição no tamanho das partículas parece ser uma possível causa do aumento da eficiência apresentada durante o teste de estabilidade observado na Figura 19.

O comportamento das distribuições de tamanho de partículas e as imagens do MEV, juntamente com os resultados de porcentagem de carbono, permitem concluir que as duas fases estacionárias sofrem mecanismos de degradação diferentes.



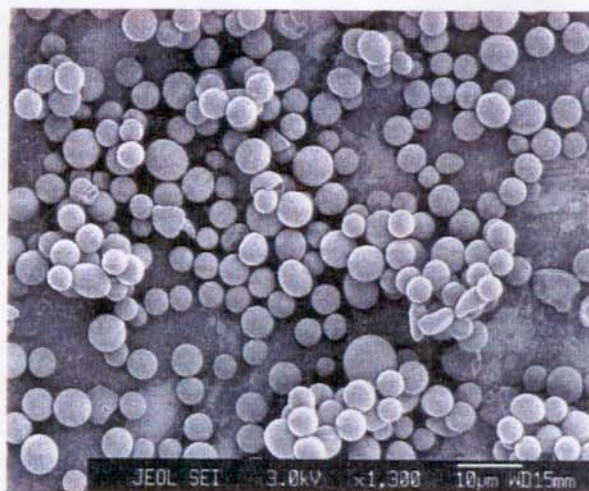
(a)



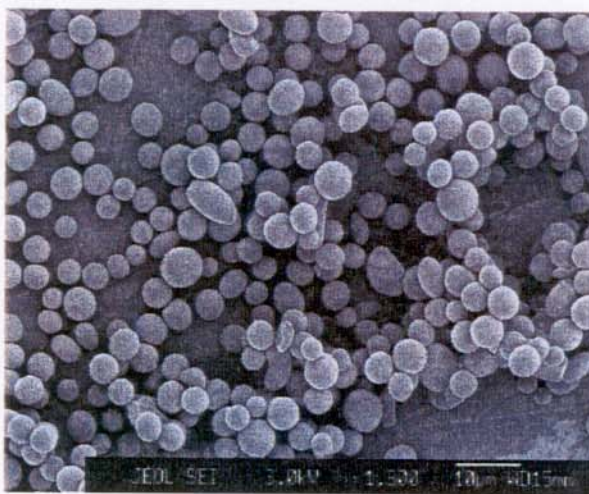
(b)

Figura 23. Imagens no MEV das fases estacionárias iniciais (a) Novapak-C18 e (b) Davisil Zr-(PMOS).

(a)



(b)



(c)

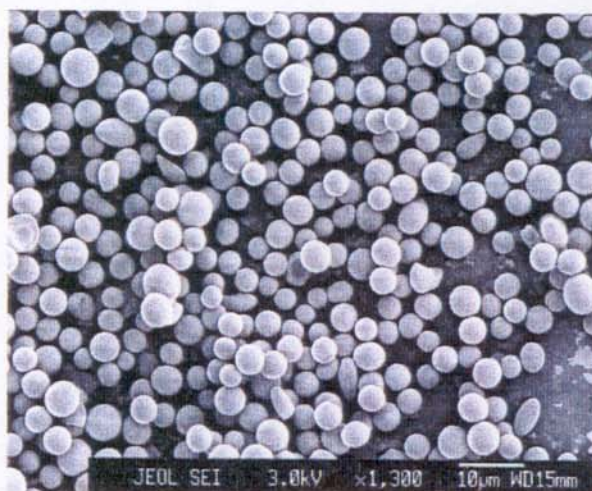


Figura 24. Imagens no MEV das fases estacionárias em partes diferentes da coluna Novapak-C18 após a degradação: (a) entrada, (b) meio e (c) saída.

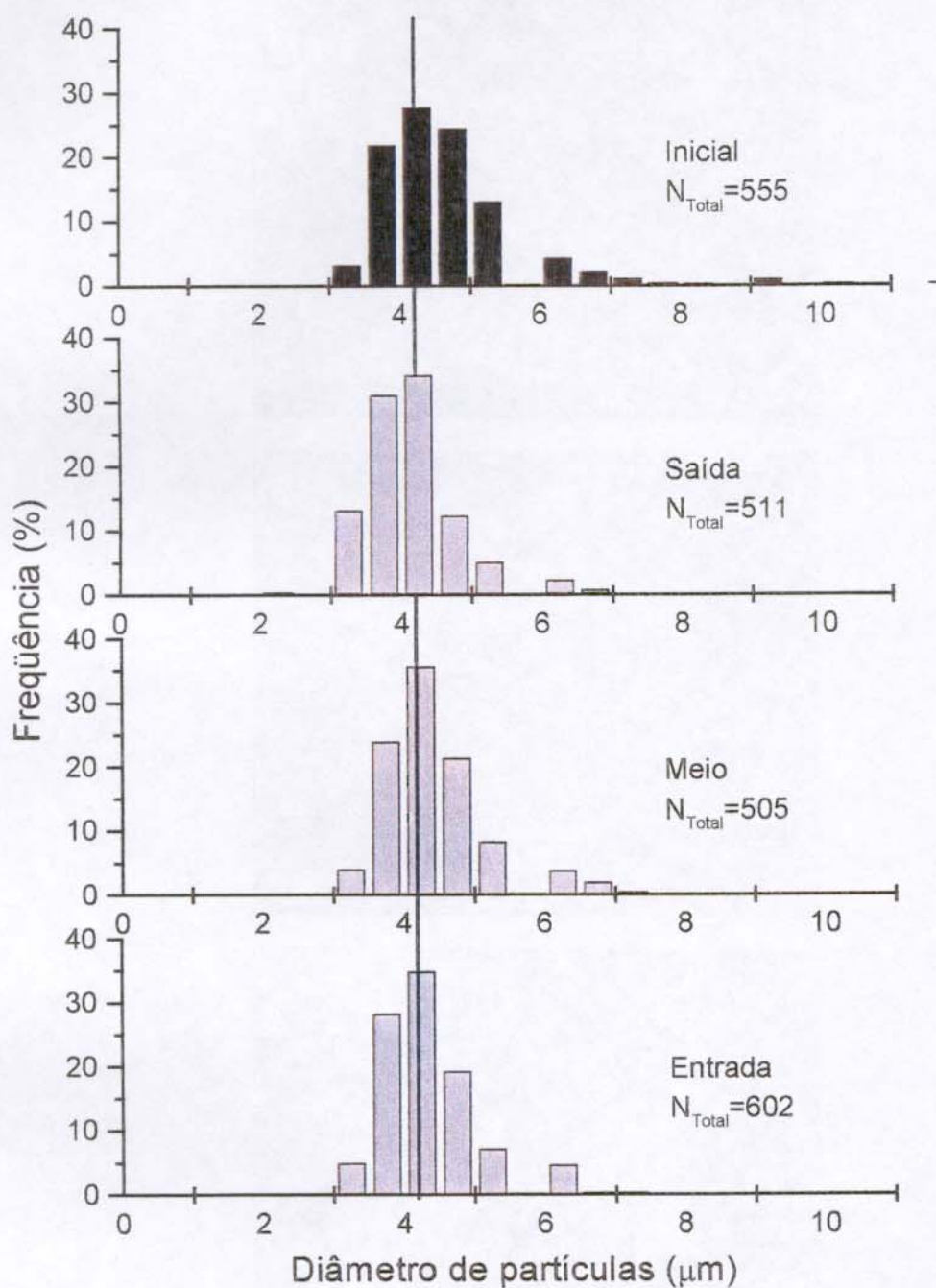
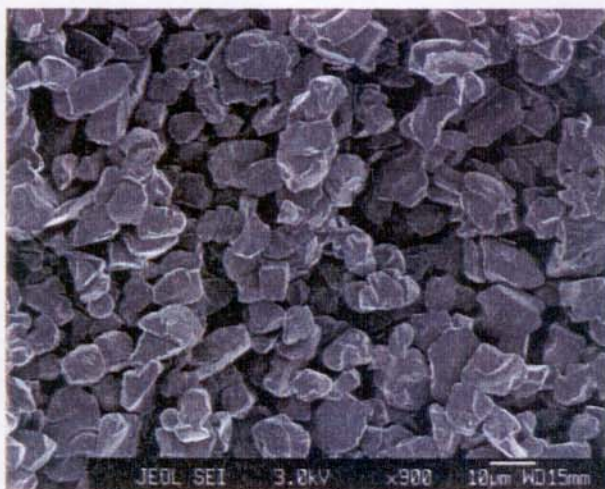


Figura 25. Distribuição do tamanho de partículas da fase estacionária da coluna Novapak C18, antes e após a degradação.

(a)



(b)



(c)

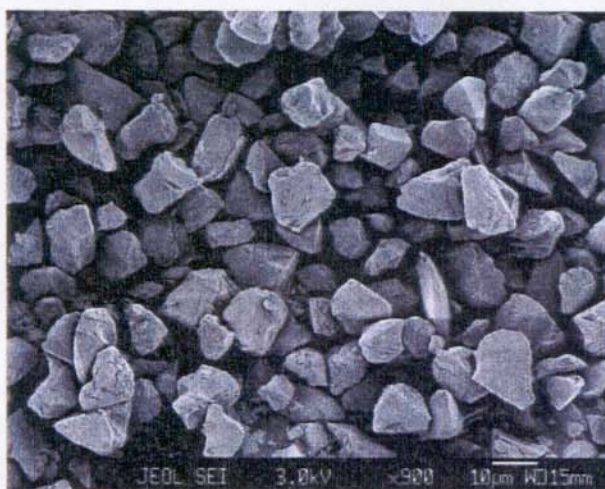
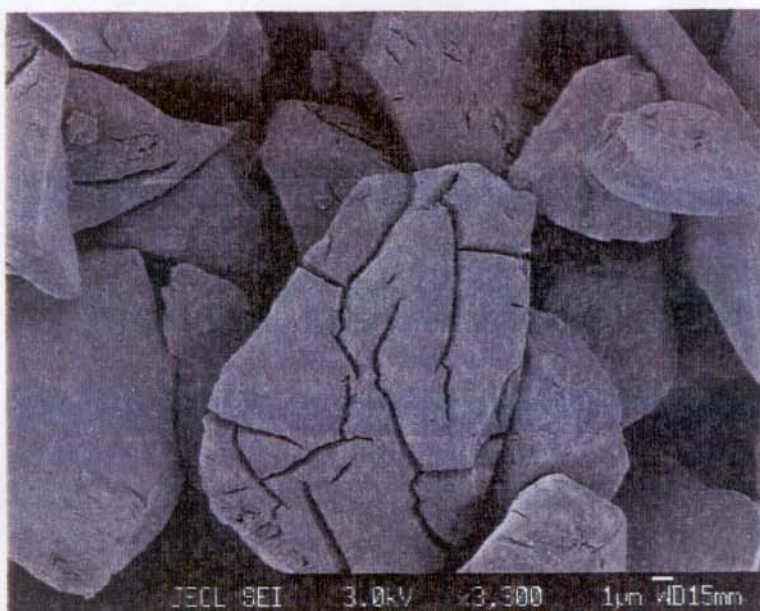
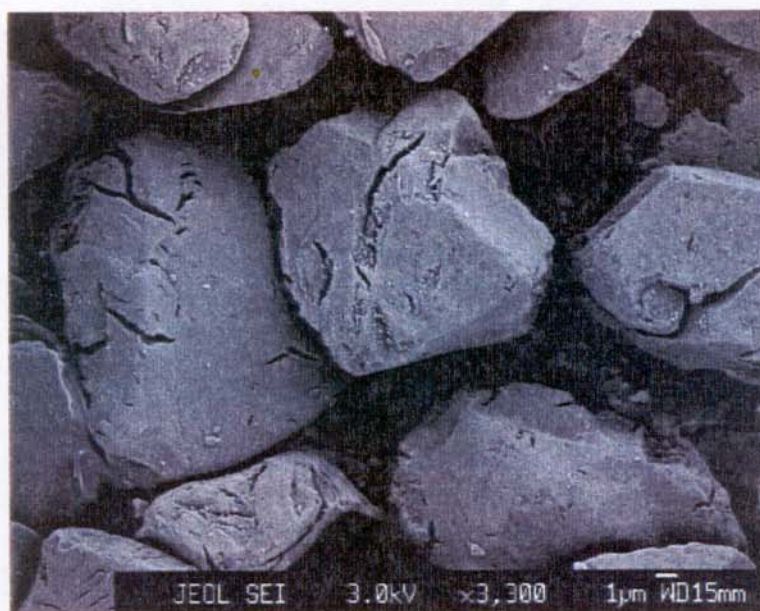


Figura 26. Imagens no MEV das fases estacionárias em partes diferentes da coluna Davisil Zr-(PMOS) após a degradação: (a) entrada, (b) meio e (c) saída.



(a)



(b)

Figura 27. Imagens no MEV das fases estacionárias Davisil Zr-(PMOS): (a) Inicial e (b) meio (após a degradação), mostrando as rachaduras na superfície da sílica.

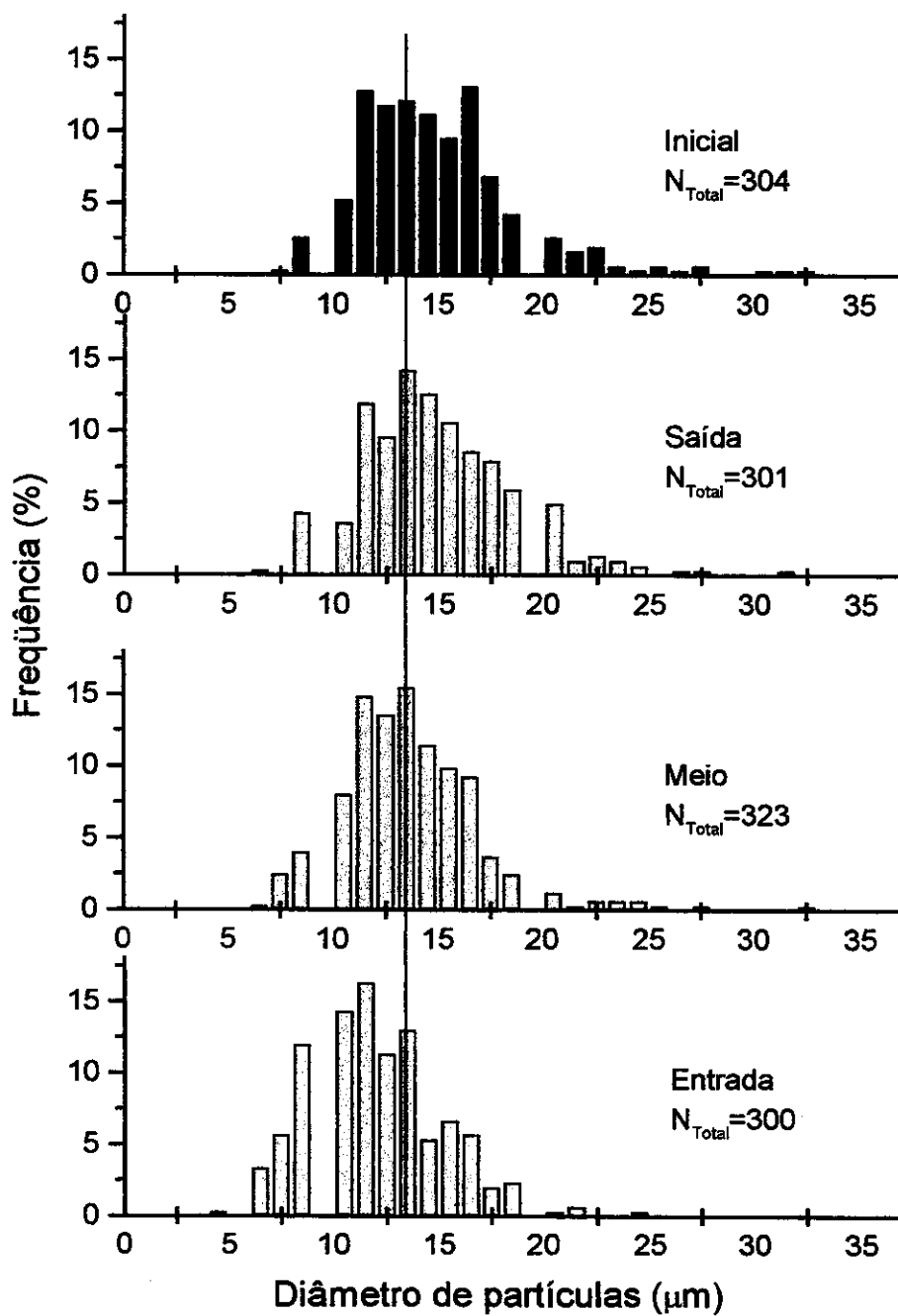


Figura 28.- Distribuição do tamanho de partículas da fase estacionária da coluna Davisil Zr -(PMOS), antes e após a degradação.

IV.3.2. Considerações do novo método de avaliação da estabilidade

O novo método de avaliação, além de rápido e simples, oferece vantagens quanto ao custo por volume gasto de solvente, uma vez que utiliza como modificador orgânico o metanol, bem mais barato que a acetonitrila, e em uma quantidade bem menor. Por exemplo, a firma Mallinckrodt vende as garrafas de 4L de metanol por \$ 36,00, enquanto a acetonitrila custa \$74,00. Também o tempo necessário para obter os testes de estabilidade das colunas é reduzido, sendo muito bom para estudantes de pós-graduação que tem um tempo limitado para realizar os trabalhos de pesquisa. Este tempo também é precioso para os técnicos que precisam fazer testes de estabilidade nas grandes empresas produtoras de fases estacionárias. Quanto à energia elétrica, apesar de utilizar temperatura para acelerar os testes, o consumo é bem menor (precisa-se no máximo de dois dias), comparado com a energia consumida pelas bombas, detector e computador nos testes habituais que requisitam 5 meses ou mais.

Diferentemente dos métodos descritos na literatura, que simulam melhor as condições em uso de rotina, o novo método poderia ter a desvantagem de não reproduzir exatamente os mecanismos de degradação que acontecem nestas condições. Porém, isto não impossibilita que possa ser usado para estabelecer um limite inferior do tempo de vida das colunas, o qual é um parâmetro muito importante na avaliação das mesmas.

V. CONCLUSÕES

Os testes realizados para a coluna Davisil (PMOS) com o aumento progressivo da temperatura definiram que, quando são usadas fases móveis neutras e temperaturas altas, as características da coluna permanecem praticamente inalteradas por um tempo longo de uso, podendo ser usada qualquer vazão da fase móvel para fazer as avaliações do teste de estabilidade.

Colunas preparadas com polímero sorvido na sílica e que levaram maior tempo entre o preparo da fase e o enchimento da coluna resultaram em fases estacionárias mais estáveis quando usaram-se temperaturas maiores que 30°C, devido a maior quantidade de polímero sorvido na sílica.

O uso de fases móveis alcalinas que contêm carbonato, além do uso de altas temperaturas, irão acelerar a degradação da coluna, devido a maior solubilização da sílica. As colunas Rainin C18, Hypersil ODS e Rainin C8 mostraram certa estabilidade a pH 10, enquanto que a coluna Davisil (PMOS) degradou logo no início.

A coluna Davisil, que apresenta apenas uma camada de polímero sorvida sobre a superfície da sílica, apresentou uma estabilidade bem melhor em condições de pH 8,4. Entretanto, para valores de pH maiores ocorreu uma rápida degradação da coluna, não se observando o patamar das melhores condições cromatográficas.

A vazão da fase móvel alcalina aparece como outro fator que influencia a velocidade de dissolução da sílica e a conseqüente degradação da coluna. Assim, para um mesmo volume de fase móvel alcalina a ser utilizada, vazões menores favoreceram um contato maior entre a fase estacionária e a fase alcalina, produzindo uma maior dissolução da sílica.

A fase móvel utilizada para fazer as avaliações da coluna (injeção da amostra) durante o teste de estabilidade não interfere no comportamento de degradação, sendo que este estudo pode ser feito em menor tempo quando a coluna é avaliada na mesma fase teste.

Assim, pode-se concluir que, partindo-se de fases estacionárias sorvidas, mais simples e menos protegidas de possíveis ataques da fase móvel alcalina (Davisil com PMOS), condições de pH 8,4, temperaturas de 60°C, vazão da fase móvel alcalina de 0,6 mL min⁻¹, realizando-se avaliações na mesma fase teste, permitem estudar a estabilidade destas colunas de maneira rápida, simples e efetiva com pouco gasto de solvente.

Um novo procedimento para avaliar a estabilidade de fases estacionárias quimicamente ligadas ou imobilizadas, tipo fase reversa, foi conseguido com o uso de menor quantidade de solvente e em menor intervalo de tempo. As condições utilizadas foram: fase móvel a pH 10 (MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH (50:50)), temperatura de 60°C, vazão da fase móvel alcalina de 1 mL min⁻¹ e avaliações feitas na mesma fase teste.

Através da comparação da estabilidade de colunas comerciais de alta estabilidade (Hypersil ODS e Novapak C18) pelo método reportado na literatura e o método estabelecido neste trabalho, chegou-se à conclusão que o gasto de 250 mL de fase móvel alcalina equivaleria a 6 meses de uso, se fossem usadas as condições da literatura.

Com o novo procedimento de avaliação da estabilidade reduz-se o gasto com solventes, uma vez que foram usados menos de 1 % do utilizado nos testes reportados na literatura. Ainda, são requeridos no máximo dois dias para realizar o teste ao invés de 6 meses. Tais condições são de alta importância em pesquisas que pretendem avaliar novas fases estacionárias, tanto o tipo quimicamente ligado quanto o tipo com polímero sorvido e/ou imobilizado no suporte.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Poole, C.F., Poole, S.K., "Chromatography Today", Elsevier, Amsterdam, 1991.
2. Anazawa, T.A., Carraro, F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High-Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C₁ and C₈ Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles ", *J. Chromatogr.*, **697** (1995) 159.
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 ", *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994), 1265.
4. Petro, M., Berek, D., "Polymers Immobilized on Silica Gels as Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **37** (1993) 549.
5. Heinemann, G., Köhler, J., Schomburg, G., "New Polymer Coated Anion-Exchange HPLC-Phases. Immobilization of Poly(2-hydroxy,3N-ethylenediamin)butadiene on Silica and Alumina", *Chromatographia*, **23** (1987) 435.
6. da Silva, M.C.H., Jardim, I.C.S.F., "Preparation of a C₁₈ Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation for Use in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **21** (1998) 2447.
7. Ohmacht, R., Kele, M., Matus, Z., "Polymer Coated Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **28** (1989) 19.
8. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography ", 2ª edição, New York, 1979.
9. Engelhardt, H., Ahr, G., "Properties of Chemically Bonded Phases", *Chromatographia*, **14** (1981) 227.
10. Engelhardt, H., Dreyer, B., Schmidt, H., "Properties and Diversity of C₁₈ Bonded Phases", *Chromatographia*, **16** (1982) 11.
11. Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Farlee, R.D., "Synthesis and Characterization of Highly Stable Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography Columns Packings", *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2.
12. Kirkland, J.J., Henderson, J.M., "Reversed-phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases"; *J. Chromatogr. Sci.*, **32** (1994) 473.
13. Majors, R.E., "Twenty-Five Years of HPLC Column Development – A Commercial Perspective ", *LC –GC*, **12** (1994) 508.
14. Majors, R.E., "Current Trends in HPLC Column Usage", *LC–GC*, **15** (1997) 1008.

15. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., "Practical HPLC Method Development", 2ª edição, John Wiley and Sons, New York, 1997.
16. Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatography Column Packing", *J. Chromatogr.*, **549** (1991) 1.
17. Nawrocki, J., "The Silanol Group and its Role in Liquid Chromatography ", *J. Chromatogr. A*, **779** (1997) 29.
18. Verzele, M., "Trace Metals in Silica Gel Based HPLC Packing Materials", *LC-GC*, **1** (1981) 217.
19. Roth, M., Novák, J., David, P., Novotny, M., "Thermodynamic Studies into a Sorption Mechanism within the Cross-Linked Polysiloxane Stationary Phases" *Anal. Chem.*, **59** (1987) 1490.
20. Stadalius, M.A., Berus, J.S., Snyder, L.R., "Reversed-phase HPLC of Basic Samples", *LC-GC*, **6** (1988) 494.
21. Karch, K., Sebestian, I., Halász, I., Engelhardt, H., "Optimization of Reversed-Phase Separations", *J. Chromatogr.* **122** (1976) 171.
22. Glajch, J.L., Kirkland, J.J., Köhler, J., "Effect of Column Degradation on the Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Peptides and Proteins", *J. Chromatogr.*, **384** (1987) 81.
23. Unger, K.K., "Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", New York, 1979.
24. Nahum, A., Horváth, C., "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I – Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 53.
25. Glajch, J.L., Kirkland, J.J., "Sterically Protected, Mono-Functional-Silane Bonded-Phase Columns for High-Performance Liquid Chromatography", *LC-GC*, **8** (1990) 140.
26. Scholten, A.B., de Haan, J.W., Claessens, H.A., Van de Ven, L.J.M., Cramers, C.A., "²⁹Silicon NMR Evidence for the Improved Chromatographic Siloxane Bond Stability of Bulky Alkylsilane Ligands on a Silica Surface", *J. Chromatogr. A*, **688** (1994) 25.
27. Houbenová, A., Claessens, H.A., de Haan, J.W., Cramers, C.A., Stulik, K., "An Investigation Concerning the Stability of a Sterically Protected Cyanopropyl Modified Silica Substrate", *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994) 49.

28. Sagliano, N., Floyd, J.R., Hortwick, R.A., "Studies on the Stabilization of Reversed Phases for Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **443**, (1988) 155.
29. Schomburg, G., Decke, A., Köhler, J., Bien-Vogelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids in Reversed-and Normal-Phase Liquid Chromatography. Production and Testing of Materials for Bonded-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **282** (1983).
30. Schomburg, G., Köhler, J., Figge, H., Deege A., Bien-Vogelsang U., "Immobilization of Stationary Líquids on Sílica Particles by γ -Radiation ", *Chromatographia*, **18** (1984) 265.
31. Ohtsu, Y., Shiojuna, Y., Okumura, T., Koyama, J.-I., Nakamura, K., Nakata, O., Kimata, K., Tanaka, N., "Performance of Polymer-Coated Silica C18 Packing Materials Prepared from High Purity Silica Gel. Suppression of Undesirable Secondary Retention Processes ", *J. Chromatogr.*, **481** (1989) 147.
32. Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Anazawa, T.A., "Radiation Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on Silica for Use in HPLC: a Uniform Layer Model", *J. Chromatogr. A*, **849** (1999) 299.
33. Basso, M.A., " Avaliação da Radiação Gama como Agente de Imobilização de Algumas Fases Estacionárias sobre Suportes para Uso em Cromatografia Gasosa ", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 1989.
34. Anazawa, T.A., " Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida Sobre Suportes de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP., 1992.
35. Engelhardt, H., Löw, H., Eberhardt, W., Mauß, M., "Polymer Encapsulated Stationary Phases: Advantages, Properties and Selectivities", *Chromatographia*, **27** (1989) 535.
36. Wirth, M.J., Fatunmbi, H.O., "Horizontal Polymerization of Mixed Trifunctional Silanes on Silica. 2 Application to Chromatographic Silica Gel", *Anal. Chem.*, **65** (1993) 822.
37. Fairbank, R.W.P; Wirth, M.J.; "Role of Surface-Adsorbed Water in the Horizontal Polymerization of Trichlorosilanes", *J. Chromatogr. A*, **830** (1999) 285.
38. Akapo, S.O., Fatunmbi H., "The Performance of Mixed Horizontally Polymerized Phases Versus Conventional C18 Silica Columns for Reversed-Phases HPLC", *LC-GC*, **17** (1999) 334.

39. Li, L., Carr, P.W., Evans, J.F., "Studies of Retention and Stability of a Horizontally Polymerized Bonded Phase for Reversed Phase Liquid Chromatography ", *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 153.
40. Pesek, J.J., Matyska, M.T., Ramakrishnan, J., " Synthesis and Characterization of Titania Based Stationary Phases Using the Silanization/Hydrosilation Method", *Chromatographia*, **44** (1997) 538.
41. Zuo, Y.M., Zhu, B.R., Liao, Y., Gui, M.D., Pang, Z.L., Qi, J.X., "Polymer Encapsulated Packing Materials for Reversed Phase Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **38** (1994) 756.
42. Bien-Volgelsang, U., Deege, A., Figge, H., Köhler, J., Schomburg, G., "Syntheses of Stationary Phases for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating", *Chromatographia*, **19** (1984) 170.
43. Figge, H., Deege, A., Köhler, J., Schomburg, G., "Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. Coating of Silica by Polymers of Various Polarities", *J. Chromatogr.*, **351** (1986) 393.
44. Crini, G., Morcellet, M., "HPLC of Structural Isomers with Cyclodextrin-poly(vinylamine)-Coated Silica Columns, Part I: Synthesis and Characterization of Cyclodextrin-Bonded Stationary Phases by NMR Solid State", *J. Chromatogr. Sci.*, **34** (1996) 477.
45. Crini, G., Morcellet, M., "HPLC of Structural Isomers Using Cyclodextrin-poly(vinylamine)-Coated Silica Columns, Part II: Retention Behavior and Separation", *J. Chromatogr. Sci.*, **34** (1996) 485.
46. Crini, G., Lekchiri, Y. Janus, L., Morcellet, M., Morin, N., "Beta-Cyclodextrin-Copolymers Coated on Silica Beads: Synthesis, Characterization and Retention Behavior in HPLC", *Chromatographia*, **50** (1999) 661.
47. Hetem, M.J.J., De Haan, J.W., Claessens, H.A., Cramers, C.A., "Characterization and Stability of Silanized and Polymer-Coated Octadecyl Reversed Phases", *J. Chromatogr.*, **540** (1991) 53.
48. O'Gara, J.E., Alsen, B.A., Petersen, J.S., Niederlander, C.L., Neue, U.D., "Simple Preparation of C8 HPLC Stationary Phase with Internal Polar Functional Groups", *Anal. Chem.*, **67** (1995) 3809.

49. Dawkins, J.V., "Chromatographic Characteristics of Polymer-Based High-Performance Liquid Chromatography Packings", *J.Chromatogr.*, **352** (1986) 157.
50. Kurganov, A., Trüdinger, U., Isaeva, T., Unger, K.K., "Native and Modified Alumina, Titania e Zirconia in Normal and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **42** (1996) 217.
51. Trüdinger, U., Müller, G., Unger, K.K., "Porous Zirconia and Titania as Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **535** (1990) 111.
52. Weber, T.P., Carr, P.W., Funkenbusch, E.F., "Evaluation of a Zirconia-Based Carbon-Polymer Composite Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **519** (1990) 31.
53. Yu, J., El-Rassi, Z., "Reversed-Phase Liquid Chromatography of Dansyl Aminoacids with Microspherical Octadecyl-Silica and Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases", *J. Liq. Chromatogr.*, **16** (1993) 2931.
54. Schafer, W.A., Carr, P.W., Funkenbusch, E.F., Parson, K.A., "Physical and Chemical Characterization of Porous Phosphate-Modified Zirconia Substrate", *J. Chromatogr.*, **587** (1991) 137.
55. Kawahara, M., Nakamura, H., Nakajima, T., "Titania and Zirconia: Possible new Ceramis Microparticulates for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **515** (1990) 149.
56. Rigney, M.P., Funkenbusch, E.F., Carr, P.W., "Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia", *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 291.
57. Wirth, H.J., Eriksson, K-O., Holt, P., Aguilar, M., Hearn, M.T.W., "High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins. CXXIX. Ceramics-Based Particles as Chemically Stable Chromatographic Supports", *J. Chromatogr.*, **646** (1993) 129.
58. Cheng, Y.-F., Walter., T.H., Lu, Z.; Iraneta, P., Alden, B.A., Gendreau, C., Neue, U.D., Grassi, J.M., Carmody, J.L., O'Gara, J.R., Fisk, R.P., "Hybrid Organic-Inorganic Particle Tecnology: Breaking Through Traditional Barriers of HPLC Separations", *LC-GC*, **18** (2000) 1162.

59. Neue, U.D., Walter, T.H., Iden, B.A., Giang, Z., Fisk, R.P., Cook, J.T., Glase, K.M., Carmody, J.L., Grassi, J.M., Cheng, Y.-F., Lu, Z., Cromley, R.J., "Use of High-Performance LC Packing from pH 1 to pH 12", *Am. Lab.*, **31** (1999) 36.
60. Silva, R.B., Collins, C.H., "Chromatographic Evaluation of Radiation Immobilized Poly(methyloctylsiloxane) on Titanium-Grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, **845** (1999) 417.
61. Silva, R.B., Collins, K.E., Collins, C.H., "Effects in High Performance Liquid Chromatography of a High pH in the Mobile Phase on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized by γ -Radiation on Titanium-Grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, **869** (2000) 136.
62. Melo, L.F.C., Jardim, I.C.S.F., "Development of C-8 Stationary Phases Immobilized by Gamma Radiation on Zirconized Silica for High Performance Liquid Chromatography Applications", *J. Chromatogr. A*, **845** (1999) 423.
63. Melo, L.F.C., Collins, C.H., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with Poly(methyloctylsiloxane) Sorbed and Radiation Immobilized onto Porous Silica and Zirconized Silica", *J. Chromatogr. A*, **869** (2000) 129.
64. Nobuhara, K., Kato, M., Nakamura, M., Takami, M., Kaneko, S., "Preparation and Evaluation of Magnesium-Coated Silica as Column Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **704** (1995) 45.
65. Wheals, B.B., "Isocratic Multi-column High-Performance Liquid Chromatography as a Technique for Qualitative Analysis and its Application to the Characterization of Basic Drugs Using an Aqueous Methanol Solvent", *J. Chromatogr.*, **187** (1980) 65.
66. Law, B., Chan, P.F., "Stability of Silica Packing Materials Towards a Mixed Aqueous-Organic Eluent at Alkaline pH", *J. Chromatogr.*, **467** (1989) 267.
67. Kirkland, J.J., Van Straten, M.A., Claessens, H.A., "High pH Mobile Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Columns", *J. Chromatogr. A*, **691** (1995) 3.
68. Claessens, H.A., Van Straten, M.A., Kirkland, J.J., "Effects of Buffers on Silica-Based Column Stability in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **728** (1996) 259.

69. Kirkland, J.J., "Stability of Silica-Based, Monofunctional C18 Bonded-Phase Column Packing for HPLC at High pH", *J. Chromatogr. Sci.*; **34** (1996) 309.
70. Kirkland, J.J., Henderson, J.W., Destefano, J.J., Van Straten, M.A., Claessens, H.A., "Stability of Silica-Based, Endcapped Columns with pH 7 and 11 Mobile Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **762** (1997) 97.
71. Kirkland, J.J., "The Use of Porous Silica-Based Column Packing in HPLC Method Development", *LC-GC Special Issue on Current Issues in HPLC Technology*, May 1997, S46.
72. Hetem, M.J.J., de Haan, J.W., Claessens, H.A., van de Ven, L.J.M., Cramers, C.A., "Influence of Alkyl Chain Length on the Stability of n-Alkyl-Modified Reversed Phases. 1. Chromatographic and Physical Analysis", *Anal. Chem*, **62** (1990) 2288.
73. Kirkland, J.J., van Straten, M.A., Claessens, H.A., "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Basic Compounds at pH 11 with Silica-Based Column Packings", *J. Chromatogr. A*, **797** (1998) 111.
74. Catalogo Phenomenex, "What Makes Luna HPLC Columns Ideal for LC/MS?", June 30 (2000).
75. Verstraeten, W., de Zeeuw, J., Crombeen, J., Vonk, N., "Next-Generation Universal Columns for RPLC", *Am. Lab.* **32** (2000) 20.
76. Pinto, G.M.F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "C18 Stationary Phases Sorbed on Zirconized Silica for Use in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, submetido a publicação.
77. Peixoto, C.R.M., Gushikem, Y., Baccan, N., "Selective Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Chromium (VI) Using a Flow Injection System with a Microcolumn of Zirconium (IV) Oxide Modified Silica Gel", *Analyst*, **117** (1992) 1029.
78. Anazawa, T.A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, tipo C8, para CLAE ", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
79. Trindade, M.F.S., "Estudo da Influência da Radiação Gama sobre Fases Comerciais utilizadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, 1992.

80. Collins, K.E., Bottoli, C.B.G., Bachmann, S., Vigna, C.R.M., Albert, K., Collins, C.H., "Self-Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on Silica for Use in HPLC", *Chem. Mat.*, submetido para publicação.
81. Braithwaite, A., Smith, F.J., "Chromatographic Methods", 4^a edição, Chapman and Hall, London, 1985.
82. Rigney, M.P., Weber, T.P., Carr, P.W., "Preparation and Evaluation of Polymer-Coated Zirconia Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **484** (1989) 273.

ANEXO 1

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Fases bidentadas (Sílica Zorbax)	Condições de teste e avaliação: ACN/TFA (0,1%) (50:50) 1,0 mL/min; 50°C, durante 96 h Soluto (k): 1-fenil-heptano	Com os grupos isopropil apresentaram poucas variações de k até 4500 Vc Com os grupos metil o k caiu de forma contínua e rápida O comprimento da cadeia aumentou a estabilidade dos grupos dimetil-alquilanos (decrécimo mais lento de k para C8 e C18)	11
Fases ligadas convencionais (Sílica Zorbax)		O -Si(iPr) ₂ C8 apresentou comportamento de k comparável com as fases bidentadas	
Fases protegidas estericamente (Sílica Zorbax)			
Sílica Spherisorb S5W (200 x 4,6 mm)	Condições de teste: MeOH/acetato de amônia, pH 9,2 (90:10), 2 mL/min Condições de avaliação: Mesma fase móvel a 1,0 mL/min Solutos (k, h): difenilamina, cafeína, propanolol, clorcicloguanil, cloreto de benzetonio	A eficiência caiu com a passagem de 46 L. Até 45 L o k variou muito pouco. Com uma vazão de 1 mL/min e 7 h de trabalho/d = 107 d = 5 meses de uso contínuo sem perda de eficiência.	66

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
RP-C18 (sílica Lichrosorb Si 100, fase ligada convencional)	Condições de teste: tampão TRIS (0,1 mol/L), pH 7,5; 40°C Condições de avaliação: MeOH/H ₂ O (49:51); 1,0 mL/min	Contínuo decréscimo de k. Em 3000 Vc seu valor caiu pela metade	35
Sílica Lichrosorb Si 100 encapsulada com polímero	Solutos (k, H): tolueno, etilbenzoato, anilina	A eficiência teve poucas mudanças, caindo bruscamente em 5000 Vc. O valor de k permaneceu quase constante até 6500 Vc	
Fase quimicamente ligada e capeada. Sílica Chromsil (150 x 4,6 mm)	Condições de teste e avaliação: MeOH/tampão de fosfato (55:45). pH 2,3 (contendo ácido acético e ácido bórico) pH 9,0 (ajustado com NaOH) Solutos (k): etilbenzeno	No pH ácido, o valor de k teve uma ligeira queda durante os primeiros 4000 Vc, depois manteve-se constante até o fim do teste (8000 Vc). No pH básico, não foram observadas mudanças no k até 8000 Vc.	7

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Sílicas tipo B: Zorbax RX- C18 (dimetil-C18)	Condições de teste: MeOH/Na ₂ HPO ₄ 0,01 mol L ⁻¹ + NaOH, pH 9 (60:40); 1,0 mL min ⁻¹ ; temp. ambiente	A eficiência das colunas com fases protegidas estericamente (diisopropil e diisobutil) caiu bruscamente em 12000 Vc. Em 34000 Vc a dimetil-C18 ainda era estável (85 L).	67
Zorbax SB-C8 (diisopropil-C8)	Condições de avaliação: MeOH/H ₂ O (60:40); 1,0 mL min ⁻¹	O valor de k não variou muito para a fase de dimetil-C18, entretanto, para as outras duas teve um ligeiro decréscimo.	
Zorbax SB- C18 (diisobutil-C18)	Soluto (k, H): naftaleno		
(150 x 4,6 mm)			
Hypersil ODS (capeada)	Condições de teste: ACN/Na ₂ HPO ₄ 0,01 mol L ⁻¹ + NaOH, pH 9 (50:50); 1,0 mL min ⁻¹ ; temp. ambiente	A coluna Hypersil não degradou até 33000 Vc. As colunas Zorbax RX-C18 e Novapak degradaram em 20000 Vc e 23000 Vc, respectivamente. Para a coluna Nucleosil a eficiência caiu desde o início.	67
Zorbax RX- C18 (dimetil-C18, não capeada)	Condições de avaliação: MeOH/H ₂ O (60:40); 1,0 mL min ⁻¹		
Novapak C18 (150 x 3,9 mm)	Soluto (H): N, N'- dimetilaniilina		
Nucleosil C18			
(150 x 4,6 mm)			

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Zorbax RX- C18 (dimetil-C18)	<p>Condições de teste: MeOH/NaOH 0,02 mol L⁻¹, pH 12,3 (50:50); 1,0 mL min⁻¹; temperatura ambiente</p> <p>Solutos (k, H): tolueno e N,N'-dimetilaniilina</p>	O valor de k manteve praticamente constante para ambos os solutos e a eficiência começou a cair após 15 h (~900 mL).	67
Sílica Davisil com polímeros imobilizados (PMOS e PDMS)	<p>Condições de teste: MeOH/H₂O (50:50), para o PMODS; MeOH/H₂O (70:30), para PMOS; 2 mL min⁻¹; temp. ambiente</p> <p>Condições de avaliação: Mesma fase móvel, 0,1 mL min⁻¹ para o PMODS e 0,2 mL min⁻¹ para o PMOS</p> <p>Soluto (H): naftaleno</p>	As fases mantiveram boa estabilidade até 5000 Vc	2

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
<p>Zorbax RX- C18 (dimetil-C18, densamente ligada, não capeada) (150 x 4,6 mm)</p>	<p>Condições de teste: MeOH/ tampão fosfato ou TRIS, pH 8, (20:80); 1,0 mL min⁻¹; 40 ou 60°C</p> <p>MeOH/tampão de fosfato de sódio (0,25 mol L⁻¹); 40°C</p> <p>MeOH/tampão de fosfato de sódio (0,05 mol L⁻¹); 60°C</p> <p>MeOH/tampão de TRIS (0,25 mol L⁻¹); 40°C</p> <p>MeOH/tampão de TRIS (0,05 mol L⁻¹); 60°C</p> <p>Condições de avaliação: ACN/tampão de TRIS (0,01 mol L⁻¹); (60:40); 1,0 mL min⁻¹; 40°C</p> <p>Soluto (k, H): secobarbital</p>	<p>↑ O valor de k caiu em 4000 Vc e a eficiência em 9000 Vc</p> <p>↑ O valor de k caiu em 800 Vc e a eficiência em 1500 Vc</p> <p>↑ Tanto o k como a eficiência permaneceram quase constante até 24000 Vc</p> <p>↑ O valor de k caiu em 10000 Vc e a eficiência, em 13000 Vc</p>	<p>68</p>

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
<p>Sílica sil-gel (capeada) Zorbax ODS</p> <p>Sílica sol-gel (duplamente capeada) Zorbax XDB-C8 (150 x 4,6 mm)</p>	<p>Condições de teste e avaliação: ACN/fosfato de sódio (0,02 mol/L), pH 7 (60:40); 1,0 mL/min; 40°C</p> <p>Soluto (k, N): amitriptilina</p>	<p>A eficiência da fase com sílica sil-gel caiu após 7000 Vc. Para a sílica sol-gel a eficiência variou pouco até 10000 Vc, depois começou a cair lentamente até 18000 Vc, onde foi terminado o teste.</p> <p>O valor de k para ambas fases aumentou lentamente, devida ao aumento degradativo na exposição dos grupos silanóis. Os valores para a sílica sil-gel foram mais altos.</p>	70
<p>Zorbax XDB-C8 (dimetil-C8 sobre sílica sol- gel, duplamente capeada) (150 x 4,6 mm)</p>	<p>Condições de teste: MeOH/pirrolidina (0,05 mol/L) + HCL (55:45), pH 11,5; 1,5 mL/min; 40°C</p> <p>Condições de avaliação: Mesmas condições a 1,0 mL/min</p> <p>Solutos (k, H): oxprenolol, propanolol, tolueno</p>	<p>O comportamento de k foi decrecente para os três solutos. Este valor foi maior para o propanolol.</p> <p>Até 12000 Vc a eficiência não teve mudanças, depois começou a cair lentamente até 24000 Vc</p>	70

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
<p>Colunas de dimetil-C8, sílica sol-gel</p> <p>a) não capeadas Zorbax RX</p> <p>b) duplamente capeadas Zorbax XDB</p> <p>(150 x 4,6 mm)</p>	<p>Condições de teste: MeOH/fosfato de sódio (0,25 mol/L), pH 7 (20:80); 60°C; 1,0 mL/min</p> <p>Condições de avaliação: para tolueno (H): MeOH/H₂O (80:20); 1 mL/min; 22 °C para trimipramine (k): ACN/fosfato de sódio (0,01 mol/L), pH 7 (60:40); 1,5 mL/min; 40 °C</p>	<p>Ambas colunas degradaram logo no início, mas para a coluna não capeada a eficiência caiu mais rapidamente. O capeamento da coluna retardou a dissolução da sílica.</p> <p>Os valores de k desde o começo foram maiores para a coluna não capeada, ocorrendo um aumento contínuo, devido a maior acidez da superfície do suporte.</p>	70
<p>Zorbax XDB - C8 (sol-gel, duplamente capeada) (150 x 4,6 mm)</p>	<p>Condições de teste: ACN/tampão de fosfato ou citrato ou TRIS (0,25 mol/L), pH 7 (20:80); 60°C; 1,0 ml/min</p> <p>Condições de avaliação: ACN/fosfato de sódio (0,01 mol/L), pH 7, (60:40); 22°C; 1,5 mL/min</p> <p>Solutos: tolueno (H), amitriptilina (k)</p>	<p>Com o tampão TRIS não ocorreram mudanças na eficiência até 28000 Vc. Com os outros tampões a eficiência começou a cair logo no início e mais rapidamente com o tampão de fosfato</p> <p>Com o tampão TRIS ocorreu um ligeiro decréscimo no k até 8000 Vc, depois manteve-se quase constante até 17000 Vc. O valor do k dos outros tampões também caiu desde o início.</p>	70

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Zorbax XDB- C8 (dimetil-C8, duplamente capadada, densamente ligada) (150 x 4,6 mm)	Condições de teste: AcN ou MeOH/fosfato de potássio (0,017 mol L ⁻¹), pH 11, (50:50); 1,5 mL min ⁻¹ ; 23°C Condições de avaliação: ACN/fosfato de potássio (0,017 mol L ⁻¹), pH 11, (50:50); 1,0 mL min ⁻¹ ; 40°C Solutos (H): propanolol	Com a fase móvel contendo metanol houve poucas mudanças até 1000 Vc, depois a eficiência começou a cair lentamente até 4500 Vc. Já com a acetoneitrila a queda na eficiência começou logo no início. Nota: em fases não capadas a dissolução da sílica é maior em metanol	73
Zorbax XDB- C8 (dimetil-C8, duplamente capadada, densamente ligada) (150 x 4,6 mm)	Condições de teste: MeOH/tampões de fosfato de potássio, trimetilamina ou 1-metil- piperidina, pH 11, (55:45); 1,5 mL min ⁻¹ ; 23°C Condições de avaliação: Mesma fase móvel; 1,0 mL min ⁻¹ ; 40°C Solutos (H): propanolol	Com o fosfato a eficiência caiu quase no começo do teste. A partir de 2000 Vc a queda foi brusca. Com a trimetil amina a eficiência se manteve estável até ~8000 Vc, quando começou a degradar lentamente Com 1-metil-piperidina se observaram poucas mudanças na eficiência até 32000 Vc (mais hidrofóbica) (3 meses de 8 h de trabalho).	73

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Zorbax XDB- C8 e Zorbax XDB- C18 (duplamente capeadas e densamente ligadas) Zorbax RX-SIL (coluna bidentada-C18) (150 x 4,6 mm)	Condições de teste: ACN/fosfato de potássio (0,017 mol/L), pH 11, (50:50); 1,5 mL min ⁻¹ ; 23°C Condições avaliação: MeOH/H ₂ O (80:20); 1,0 mL min ⁻¹ , temp. ambiente Solutos (H): propranolol	A eficiência para as colunas Zorbax XDB- C18 e a bidentada começaram a cair em 1200 Vc e continuaram desta maneira lenta até 7000 Vc e 9500 Vc, respectivamente. A coluna Zorbax XDB-C8 teve uma queda rápida na eficiência desde o começo.	73
Sílica YMC Fase estacionária polimerizada horizontalmente	Condições de teste e avaliação: ACN/trietil amina (0,05 mol L ⁻¹) + HAC, pH 10, (50:50); 2 mL min ⁻¹ Solutos (k): tolueno, pentilaniina	O valor de k mostrou poucas variações até 2800 Vc, sendo estes valores maiores para a pentilaniina	39

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Luna 5 μm C18 (quimicamente ligada, capeada) sílica tipo B (20 x 2,0 mm)	Condições de teste e avaliação: ACN/TFA (0,1 %), pH 1,5, (50:50) ACN/ Na_2HPO_4 (0,02 mol/L), pH 10,0, (50:50) Solutos (k, N, As): tolueno	Para os dois pH a eficiência para o tolueno manteve-se praticamente constante até 1704 h de exposição na fase móvel. O mesmo aconteceu com o k e As.	74
Omnispher C18, 5 μm (quimicamente ligada) sílica tipo B (100 x 3,0 mm)	Condições de teste e avaliação: MeOH/tampão de fosfato (0,02 mol/L), pH 8, (50:50); 1,0 mL min^{-1} MeOH/tampão de fosfato (0,02 mol/L), pH 2,1, (50:50); 1,0 mL min^{-1}	As colunas mantiveram valores de eficiência e k constante até 20000 Vc para os dois valores de pH.	75
Sílica Davisil titanizada- (PMOS) imobilizado	Condições de teste: MeOH/NaOH (70:30), 2 mL min^{-1} , 25°C, até 10000 Vc para cada pH: 7, 9, 12 e 13 Condições de avaliação: MeOH/ H_2O (70:30); 0,3 mL min^{-1} Solutos (H): naftaleno	A eficiência apresentou pouca variação até 10000 Vc exceto no pH 13, onde em 5000 Vc houve um aumento a na resistência da passagem de fase móvel, sendo assim, concluído o teste	61

Coluna	Condições	Estabilidade	Referências
Sílica Davisil com PMOS imobilizado	Condições de teste: MeOH/H ₂ O (70:30) durante 5000 Vc; seguida da fase alcalina, MeOH/tampão de amônia, pH 10 (70:30); 1,0 mL min ⁻¹ durante mais 5000 Vc; temp. ambiente	As duas colunas foram estáveis em fase móvel neutra (primeiros 5000 Vc) . Nos seguintes 5000 Vc passados com fase alcalina as mesmas mostraram algumas diferenças.	63
Sílica Davisil zirconizada com PMOS imobilizado	Condições de avaliação: MeOH/H ₂ O (70:30), 0,2 mL min ⁻¹ Soluto (k, H): naftaleno	No caso da coluna com sílica nua, a eficiência caiu quase no início do teste e a partir dos 1000 Vc permaneceu estável. O valor de k não sofreu mudanças. Para a coluna com sílica zirconizada a eficiência e o k caíram lentamente.	

Nota: Vc é o volume da coluna. A maioria destes trabalhos não especificam como este valor foi obtido.