

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS C-8
SORVIDAS E IMOBILIZADAS PARA CLAE A PARTIR DE
SÍLICA ZIRCONIZADA

Lúcio Flávio Costa Melo

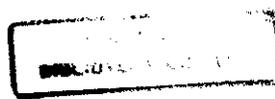
Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Junho / 1998

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP



M401D



*Mestre não é aquele que ensina;
Mestre não é aquele que aprende;
Mestre é aquele que convive.*

(Sabedoria zen-budista)

*Esse trabalho é uma homenagem
àqueles, dentre os colegas,
que se tornam Amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

à Prof^ª Dr^ª Isabel Jardim, pela orientação segura, pela sempre disponibilidade em auxiliar e, principalmente, pela liberdade que sempre deu aos seus alunos para conduzirem suas pesquisas;

aos Professores Kenneth e Carol Collins, pela lição de vida, pelo exemplo de vigor intelectual, de amor à ciência e de amor à vida;

à Prof^ª Dr^ª Tania Anazawa, pela construção da sólida base que sustenta este trabalho;

à Joely, minha nAMORada, por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins;

à Patrícia, pela importante e fundamental amizade;

aos Amigos e colegas do grupo C²B, com quem convivi durante o curso de mestrado: Ricardo 'de Brasília', Andreia, Prof. Dr. Pezzin, Zuin, André, Rosely, Carla 'Maria', Gláucia Maria, Fabiana, Denison, Maurício, Letícia, Adriana, Daniela, Pancho, Romeu H., Joseane, Marcelo 'Samamba';

ao Valtinho e ao Joãozinho, pela amizade e pelo apoio operacional no laboratório;

aos grandes Amigos e Amigas: Cristianne, Patrícia Gibin, Fábio Barros, Zanoni, Kátia 'de Brasília', Lucila, Déborah, BCláudio, Fernando Schimidt, Noemi, Flor, Flávio Henrique, Herbert;

ao pessoal da "JusticeHall": Barba, Anthony, Nelson, Thiago, Metal, Rogério e Guilerme;

ao Prof. Dr. Yoshitaka Gushikem e ao seu grupo de pesquisas (em especial à Neusa), pelo apoio na etapa de modificação da sílica com zircônio;

aos técnicos e funcionários do IQ, especialmente à Soninha, Manuela e Renata, pelo suporte técnico;

à empresa IBRAS-CBO, pela irradiação das fases estacionárias;

à Wolfgang Amadeus Mozart, cuja música foi minha fiel e infalível companheira durante os momentos de grande dificuldade desse trabalho;

aos meus Pais, Ovídio e Vitória, que sempre deram liberdade para seus filhos seguirem seus próprios caminhos;

à FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Introdução	01
CLAE: Princípios Básicos.....	02
Fases Estacionárias em CLAE.....	03
A Sílica.....	04
Suportes Alternativos.....	07
Suportes Zirconizados.....	07
Métodos de Imobilização de Fases Estacionárias Sorvidas.....	12
Imobilização de Polímeros com Radiação Gama.....	12
Enchimento de colunas.....	14
Avaliação de colunas.....	16
Objetivos	22
Experimental	23
Materiais.....	24
Reagentes e Solventes.....	24
Gases.....	24
Suporte cromatográfico.....	24
Fase Estacionária Líquida.....	25
Tubos para colunas cromatográficas.....	25
Equipamentos.....	26
Polimento interno dos tubos para colunas.....	26
Modificação da superfície da sílica com zircônio.....	27
Preparação das Fases Estacionárias.....	28
Caracterização do PMOS, do suporte e das fases estacionárias.....	29
Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	30
Fluorescência de raios-X.....	30
Análise elementar de carbono.....	30
Espectroscopia no infravermelho.....	30
Área superficial específica (A _{BET}).....	31
Análise termogravimétrica (ATG).....	31
Densidade.....	31
Avaliação Cromatográfica.....	32
Enchimento de colunas.....	33
Condicionamento de colunas.....	34
Definição da vazão de trabalho.....	34
Otimização do carregamento de PMOS.....	35
Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento.....	35
Irradiação de fases estacionárias.....	36
Teste de estabilidade em fase móvel neutra.....	36
Teste de estabilidade em fase móvel alcalina.....	37
Teste com Mistura Básica.....	37

Análise dos Resultados	38
Modificação da superfície da sílica com zircônio.....	39
Caracterização do suporte.....	39
Fluorescência de raios-X.....	39
Análise elementar de carbono.....	39
Área superficial específica (A_{BET}).....	39
Densidade.....	40
Análise termogravimétrica (ATG).....	40
Espectroscopia no infravermelho.....	42
Caracterização do poli(metiloctilsiloxano) - PMOS.....	43
Enchimento de colunas.....	45
Caracterização das fases estacionárias.....	47
Espectroscopia no infravermelho.....	47
Análise elementar de carbono.....	49
Área superficial específica (A_{BET}).....	49
Análise termogravimétrica (ATG).....	50
Avaliação Cromatográfica.....	51
Definição da vazão de trabalho.....	51
Otimização do carregamento de PMOS.....	52
Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento.....	55
Irradiação de fases estacionárias.....	56
Teste de estabilidade em fase móvel neutra.....	60
Teste de estabilidade em fase móvel alcalina.....	63
Teste com Mistura Básica.....	66
Conclusões	70
Direcionamentos Futuros.....	72
Referências Bibliográficas	74

ÍNDICE DE FIGURAS

1 - Estrutura da sílica-gel.....	05
2 - Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica amorfa.....	06
3 - Esquema representativo do entrecruzamento de cadeias poliméricas.....	14
4 - Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.....	17
5 - Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.....	20
6 - Curva da equação de van Deemter.....	21
7 - Esquema da coluna cromatográfica e conexões.....	25
8 - Esquema do sistema de enchimento.....	33
9 - Espectros no infravermelho de SiO ₂ e SiZrIII.....	41
10 - Termograma de sílica zirconizada (SiZrII)	43
11 - Espectro no infravermelho do PMOS.....	44
12 - Cromatograma de permeação em gel do PMOS.....	44
13 - Espectros no infravermelho de sílica zirconizada recoberta com 50% de PMOS sorvido, antes e após o enchimento da coluna.....	48
14 - Termograma de sílica zirconizada recoberta com 50% de PMOS sorvido.....	51
15 - Curvas de van Deemter para as colunas de sílica zirconizada com 50% PMOS sorvido.....	52
16 - Cromatogramas obtidos no estudo para otimização do carregamento de PMOS.....	54
17 - Cromatogramas obtidos no estudo para otimização da concentração das suspensões e pressão de enchimento.....	57
18 - Cromatogramas obtidos no estudo do efeito da irradiação das fases estacionárias.....	61
19 - Teste de estabilidade da coluna de sílica não modificada c/ PMOS sorvido.....	62
20 - Teste de estabilidade da coluna de sílica zirconizada com PMOS sorvido.....	62
21 - Teste de estabilidade da coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado.....	62
22 - Teste de estabilidade com fase móvel alcalina da coluna de sílica não modificada com PMOS sorvido.....	64
23 - Teste de estabilidade com fase móvel alcalina da coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado.....	64
24 - Cromatogramas obtidos na análise da mistura básica.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

1 - Variáveis que influenciam no enchimento de colunas.....	15
2 - Intervalos de eficiência de colunas disponíveis comercialmente, recheadas com fase reversa porosa.....	19
3 - Valores utilizados para a otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento.....	35
4 - Teor de zircônio nos suportes preparados.....	39
5 - Análise elementar de carbono para sílica não modificada e sílica zirconizada...39	
6 - Área superficial específica (A_{BET}) de sílica não modificada e sílica zirconizada....39	
7 - Densidade de sílica não modificada e sílica zirconizada a 22°C.....	40
8 - Análise termogravimétrica dos suportes.....	40
9 - Porcentagem de carbono e de PMOS em fases estacionárias com carregamento inicial de 50% PMOS.....	49
10 - Área superficial específica de sílica zirconizada + 50% PMOS em várias etapas.....	50
11 - Otimização do carregamento de PMOS.....	53
12 - Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento.....	55
13 - Variação de parâmetros cromatográficos em relação ao número de injeções.....	58
14 - Valores dos parâmetros cromatográficos e porcentagem final de PMOS para colunas de sílica zirconizada recheadas com fases estacionárias sorvida e irradiada.....	59
15 - Comparação dos resultados cromatográficos antes e após os testes de estabilidade.....	65
16 - Parâmetros cromatográficos obtidos com os diversos tipos de fases estacionárias preparadas na análise da mistura básica.....	67

RESUMO

Desenvolvimento de Fases Estacionárias C-8 Sorvidas e Imobilizadas para CLAE a partir de Sílica Zirconizada

Autor: Lúcio Flávio Costa Melo

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Este trabalho visa o desenvolvimento de fases estacionárias reversas para utilização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a partir de sílica zirconizada (suporte) e do polímero C-8 poli(metiloctilsiloxano)-PMOS (fase líquida).

O suporte zirconizado foi sintetizado reagindo-se sílica porosa 10 μm com butóxido de zircônio. O material foi caracterizado por fluorescência de raios-X, análise elementar de carbono, espectroscopia no infravermelho, área superficial específica, análise termogravimétrica e medida de densidade.

O polímero foi sorvido ao suporte sintetizado e imobilizado posteriormente com radiação gama, nas doses de 80 e 120 kGy, para a obtenção dos materiais com os quais foram recheadas as colunas cromatográficas. Estes materiais foram caracterizados por testes químicos, físicos e cromatográficos.

O desenvolvimento e a avaliação cromatográfica das fases estacionárias, utilizando uma mistura sintética de cinco compostos neutros de polaridade variada, englobou as etapas de definição da composição da fase móvel ideal (MeOH:H₂O 70:30 v/v), vazão ótima de trabalho (0,2 mL.min⁻¹), otimização do carregamento de PMOS (50% m/m), da concentração das suspensões (10% m/v) e da pressão de enchimento das colunas (34,5 MPa). A avaliação da resistência química das fases preparadas, nas condições de trabalho, foi realizada através de testes de estabilidade, com a passagem pelas colunas de fases móveis neutra e alcalina em quantidade correspondente a 5000 vezes o volume da coluna. Foi testada ainda uma amostra constituída por dois compostos de caráter básico, para se avaliar o desempenho da sílica zirconizada na separação deste tipo de substância.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a modificação da superfície da sílica com zircônio e posterior recobrimento com poli(metiloctilsiloxano) e imobilização por radiação gama produz fases estacionárias para uso em CLAE com alta eficiência (40000 pratos/metro), excelentes fatores de assimetria de picos (1,0) e resolução até a linha de base.

ABSTRACT

Development of C-8 Stationary Phases Sorbed and Immobilized on Zirconized Silica for HPLC Applications

Author: Lúcio Flávio Costa Melo

Supervisor: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

The purpose of this work is the development of stationary phases for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) applications, using zirconized silica as support and the C-8 polymer poly(methyloctylsiloxane) - PMOS as liquid phase.

The zirconized silica was synthesized by reaction of 10 μm porous silica with zirconium butoxide. The support was characterized by X-ray fluorescence, elemental analysis for carbon, infrared spectroscopy, specific surface area, thermogravimetric analysis and density measurements.

The polymer was sorbed on the support and immobilized by gamma radiation, at 80 and 120 kGy, to obtain column packing materials. The stationary phases were characterized by chemical, physical and chromatographic tests.

The chromatographic evaluation of the sorbed and irradiated stationary phases, using a synthetic mixture of five neutral compounds with variable polarity, includes definition of the mobile phase composition (MeOH:H₂O 70:30 v/v) and flow rate (0,2 mL.min⁻¹) and optimization of the PMOS loading (50% w/w), slurry packing concentration (10% w/v) and column packing pressure (34,5 MPa). The chemical stability of stationary phases, under working conditions, was studied by passing neutral and alkaline mobile phases through the columns up to 5000 column volumes. A basic compound mixture was also studied, to evaluate the performance of zirconized silica for this kind of separation.

The results permit concluding that the surface modification of silica with zirconium, followed by sorption of poly(methyloctylsiloxane) and gamma immobilization, gives stationary phases for HPLC applications with high efficiencies (40000 plates/m); excellent asymmetry factors (1,0) and base line peak resolution.

*“Nossa exploração não deve nunca cessar
e o final de toda nossa exploração
será voltarmos ao ponto de onde partimos
e o conhecer pela primeira vez.”*

(T.S. Eliot, “Little Gidding”)

*“(...) Começou às cegas, porém, dentro de um mês,
adquiriu o sentimento que todo cientista
reconhece: o infindável estalido quando
peças inesperadas caem no lugar,
quando anomalias tediosas deixam de
ser anômalas. Era o sentimento da verdade.”*

(Isaac Asimov, “O Despertar dos Deuses”)

INTRODUÇÃO

*"O início é a metade do todo."
(Pitágoras)*

Informação é uma das necessidades básicas da sociedade humana. A informação gera e transmite conhecimento, que é elemento fundamental para o desenvolvimento de qualquer tecnologia e de qualquer sociedade.

O objetivo final de toda técnica empregada em química analítica é fornecer algum tipo de informação, seja qualitativa, seja quantitativa, sobre sistemas submetidos à investigações que vão explorar suas propriedades químicas e físicas.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), sendo um dos mais importantes métodos analíticos de separação, busca informações acerca de um sistema químico, explorando a capacidade de separação das substâncias de uma mistura, pela migração seletiva de seus componentes no meio através do qual são conduzidas.

CLAE: Princípios Básicos

O processo cromatográfico consiste, essencialmente, na passagem de uma fase móvel (FM) sobre uma fase estacionária (FE), ocorrendo a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases, de tal forma que cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária¹. A fase móvel é bombeada sob alta pressão e a uma vazão controlada. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida através de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna e do detector.

As separações em CLAE dependem fundamentalmente da composição das fases móvel e estacionária. A fase estacionária, devido às suas propriedades de superfície, exerce papel decisivo nos mecanismos de separação de componentes químicos e é o desenvolvimento destes materiais que irá resultar em avanços tanto em eficiência quanto em especificidade das separações. O desenvolvimento da CLAE como método eficaz de separação sempre esteve relacionado à síntese de materiais adequados para o enchimento de colunas cromatográficas.

Os mecanismos de retenção em cromatografia líquida consistem de repetidas etapas de sorção e desorção ou de partição, que acontecem ao longo da coluna cromatográfica. A separação ocorre graças a diferença entre os

coeficientes de distribuição de componentes distintos entre fase estacionária e fase móvel. Os processos físicos de sorção e desorção são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals), incluindo a formação de pontes de hidrogênio, e os de partição baseiam-se na diferença de solubilidade dos componentes da amostra na fase estacionária e na fase móvel.

Fases Estacionárias em CLAE

As fases estacionárias utilizadas em CLAE são constituídas por partículas pequenas e de resistência mecânica tal que suportem as elevadas pressões a que são submetidas durante o enchimento das colunas e durante a passagem da fase móvel no processo de análise. As partículas também devem apresentar distribuição de tamanho dentro de uma faixa restrita para que haja homogeneidade no leito da coluna².

As características da fase estacionária utilizada definem sete categorias de cromatografia líquida. Na Cromatografia Líquido-Sólido (CLS), onde a fase estacionária é um sólido como sílica ou alumina, a adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a fase móvel, devido à presença de grupos ativos na superfície. A Cromatografia Líquido-Líquido (CLL) consiste de uma fase estacionária líquida adsorvida através de forças eletrostáticas ou forças de van der Waals sobre a superfície de um suporte sólido e inerte. A Cromatografia Líquida de Fase Quimicamente Ligada (CLFQL) consiste de uma fase estacionária líquida ligada quimicamente ao suporte, resultando em maior estabilidade térmica e mecânica e reduzindo problemas de solubilidade da fase estacionária na fase móvel¹. Os outros tipos de cromatografia líquida, que não estão diretamente relacionados a este trabalho, são a Cromatografia de Troca Iônica, de Exclusão por Tamanho, Quiral e de Bioafinidade.

As fases estacionárias mais utilizadas em CLAE, atualmente, são as do tipo fase reversa (CLAE-FR), onde a fase estacionária apresenta polaridade menor que a fase móvel. Estima-se que mais de 95% dos laboratórios usuários de CLAE empregam fases estacionárias tipo reversa³. A CLAE-FR usa, quase que exclusivamente, colunas recheadas com partículas de um suporte cromatográfico

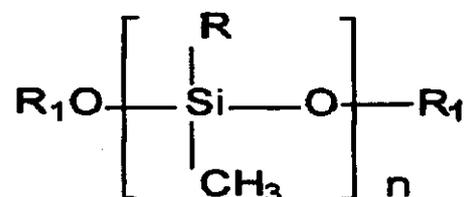
ao qual se encontram, quimicamente ligadas, cadeias moleculares orgânicas simples ou mais complexas.

As fases reversas apresentam vantagens como o uso de fases móveis de menor custo e menos tóxicas, como metanol e água; estabilidade frente a solventes; rápido equilíbrio da coluna após a troca da fase móvel; facilidade em se empregar eluição por gradiente; maior rapidez de análises e reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

As fases estacionárias líquidas são geralmente constituídas de um suporte sólido com recobrimento polimérico, de tal forma que sejam resistentes aos componentes da amostras e à fase móvel e possuam seletividade adequada para a separação.

Uma das classes mais comuns de polímeros utilizados é a dos polissiloxanos, cuja seletividade é função dos grupos substituintes existentes nas estruturas, como poli(etilmetilsiloxanos), poli(metiloctilsiloxanos), poli(metilfenilsiloxanos) e poli(metiloctadecilsiloxanos).

Os poli(metilalquilsiloxanos) apresentam fórmula geral:



onde: R= octil, dodecil, hexadecil, octadecil

R₁ = trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

A Sílica

A sílica é atualmente o material mais utilizado como suporte cromatográfico de fases reversas, devido ao fato de apresentar características favoráveis à sua ampla aplicação⁴. Estas características incluem estabilidade mecânica, suscetibilidade de modificação química da sua superfície a fim de se produzir materiais de diferentes seletividades, estabilidade química na maioria das

condições de operação e resistência a uma grande variedade de solventes. Além disso, a sílica é disponível comercialmente em uma larga faixa de tamanho de partícula, especialmente com diâmetro inferior a $20\mu\text{m}$, irregulares e esféricas, com estrutura de poros bem controlada através dos procedimentos de síntese, diâmetros de partícula em uma faixa restrita e área superficial grande, o que permite uma melhor distribuição das fases líquidas em sua superfície.

Entretanto, as fases estacionárias reversas baseadas em sílica têm algumas desvantagens que podem limitar as separações que são realizadas utilizando este suporte⁵. Estas desvantagens incluem dois aspectos: um deles é a não homogeneidade da superfície da sílica modificada com polímero; isto é, a presença de grupos silanóis e de impurezas metálicas^{6,7}, que afetam o mecanismo de retenção (interação silanofílica) de uma maneira indesejável⁸. A superfície da sílica apresenta 3 tipos de grupos silanóis: vicinais (dois grupos hidroxila sobre dois átomos de silício vizinhos), geminais (dois grupos hidroxila originários do mesmo átomo de silício) e isolados ou livres (um grupo hidroxila sobre um átomo de silício), como mostram as figura 1 e 2.

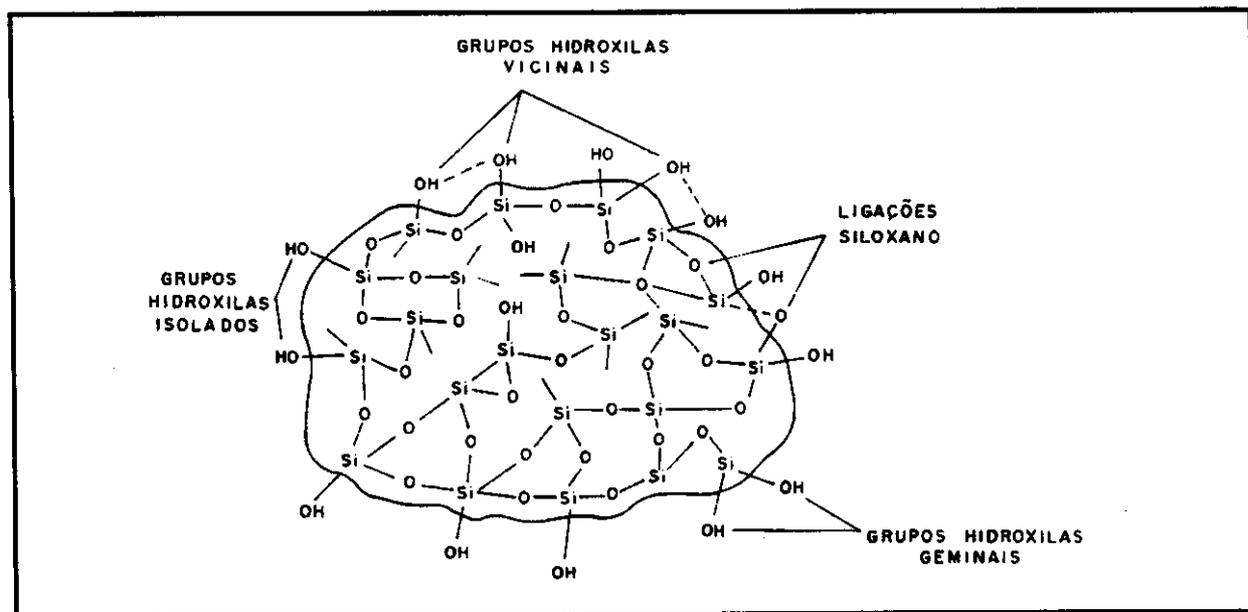


Figura 1: Estrutura da sílica-gel²

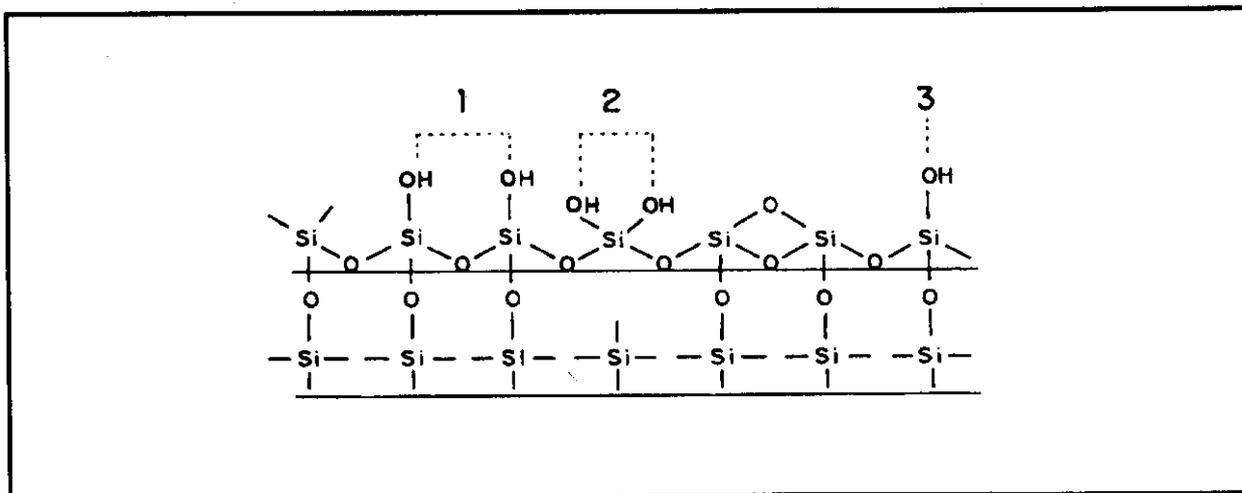


Figura 2: Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica amorfa: (1) viciniais, (2) geminais e (3) isolados⁴

Estes grupos, de caráter polar, podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas bio-orgânicas ou solutos básicos e adsorvê-los de maneira irreversível, resultando em restrição do transporte de massa, bloqueio de sítios de interação normais e criação de sítios ativos não específicos, diminuindo a eficiência cromatográfica e podendo deteriorar o leito da coluna. A adsorção pode ocorrer de forma reversível, gerando eficiências baixas para compostos básicos, com picos largos, assimétricos e com cauda.

Outro aspecto desfavorável ao uso da sílica como suporte é a instabilidade da superfície, especialmente a altas temperaturas e frente a fases móveis alcalinas, que reagem lentamente com a superfície da sílica, dissolvendo-a, causando perda da fase cromatográfica e, em casos extremos, colapso do leito da coluna⁹. Isso pode levar a alterações na retenção, seletividade e formato dos picos, além de poder contaminar os componentes da amostra em cromatografia preparativa. A estabilidade de fases estacionárias baseadas em sílica é também limitada em soluções ácidas, devido à hidrólise catalizada por ácidos das ligações siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), que sustentam as fases ligadas à superfície¹⁰. Tem sido descrito na literatura que fases estacionárias quimicamente ligadas, preparadas a partir de sílica, devem ser utilizadas com fases móveis no intervalo de pH entre 2 e 8¹¹.

Suportes Alternativos

As tentativas em superar as limitações apresentadas pela sílica vão por dois caminhos:

1) a sua substituição por um outro tipo de suporte com diferentes características químicas. Como exemplo, tem-se a utilização de fases estacionárias baseadas em polímeros semi-rígidos como poliestireno-divinilbenzeno e outras resinas baseadas em poliacrilatos, copolímeros de poliéteres hidroxilados ou polivinilálcool, que embora possuam estabilidade química sob larga faixa de pH, têm menor estabilidade mecânica que a sílica¹². Outros suportes utilizados são os óxidos inorgânicos alumina (Al_2O_3), titânia (TiO_2) e zircônia (ZrO_2), que apresentam estabilidade em uma faixa mais ampla de pH que a sílica^{10, 13-19}.

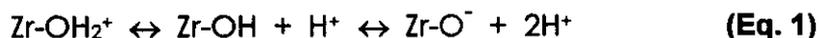
2) modificação química da própria superfície da sílica. Sílicas mais estáveis têm sido preparadas por redução drástica de impurezas inorgânicas através de tratamento ácido^{20, 21} ou modificando-se a superfície do suporte, por reação química, adicionando-se na sua superfície átomos de um metal de transição, como zircônio ou titânio (Zr ou Ti), através dos óxidos correspondentes. Ambos, zircônia e titânia, são óxidos básicos e, portanto, insolúveis em meio alcalino. Além disso, são estáveis em meio ácido, em pH abaixo de 1,0¹³.

Suportes Zirconizados

A modificação química da superfície da sílica com zircônio visa a obtenção de um material que tenha propriedades mecânicas, térmicas e químicas semelhantes às da zircônia. Vários trabalhos encontrados na literatura relatam estas propriedades e as potencialidades do uso da zircônia em CLAE^{10, 12-18, 22-28}.

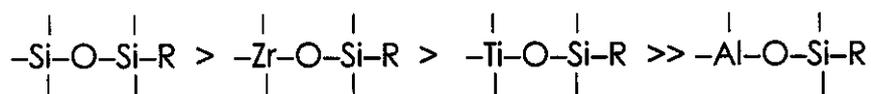
A química da superfície da zircônia, apesar de ser menos conhecida que a da sílica, apresenta características que têm tornado muito interessante a sua utilização. Além da sua estabilidade química, térmica e mecânica, o óxido de zircônio é conhecido como sendo o único óxido metálico puro que possui quatro propriedades químicas em sua superfície: acidez e basicidade, assim como propriedades oxidantes e redutoras; constitui portanto um material anfótero com propriedades de trocador aniônico em soluções neutras e ácidas e de trocador

catiônico em soluções alcalinas²². Os grupos hidroxila da superfície podem estar protonados ou desprotonados, dependendo do pH da solução, resultando em zircônia com propriedades trocadoras aniônicas e catiônicas, respectivamente¹⁷.



A superfície da zircônia pode ser modificada dinamicamente pela adição de bases de Lewis competidoras na fase móvel ou permanentemente pelo recobrimento de sua superfície com polímeros ou pela deposição de carbono²².

*Trüdinger et al.*¹³ sintetizaram, através de tratamento térmico, zircônia e titânia porosas com rígido controle de tamanho das partículas e de polaridade. Estes suportes foram submetidos à reação com octadeciltrimetoxisilano, obtendo-se assim fases reversas. A retenção e seletividade destas fases foram idênticas àquelas baseadas em sílica. A maior contribuição dos óxidos de zircônio e titânio com recobrimento polimérico C18 foi quanto à estabilidade ao pH. Os recheios a base de titânia-C18 foram estáveis até pH 11 e de zircônia-C18 até pH 12, sem afetar significativamente a capacidade cromatográfica. Este comportamento reflete bem a sequência de estabilidade hidrolítica para óxidos silanizados:



*Kawahara et al.*¹⁸ testaram materiais cerâmicos de zircônia e titânia não porosos, revelando que eles possuem maior capacidade de adsorção que a sílica e maior resistência a fases móveis, tanto ácidas quanto alcalinas. A ordem de eluição dos compostos ácidos e básicos foi inversa nas colunas de titânia e zircônia, quando comparada com a de sílica, isto é, compostos ácidos eluíram depois dos compostos básicos, sugerindo que os mecanismos de adsorção destes materiais diferem dos da sílica. Estes materiais apresentaram potencialidades na separação de substâncias de origem biológica, como ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos, que não são separados em colunas de recheio convencional.

*Rigney et al.*¹⁴ fizeram a deposição de polibutadieno (PBD) sobre a superfície de zircônia microporosa, seguida do entrecruzamento das cadeias poliméricas. Solutos ácidos apresentaram interações muito fortes com a superfície da zircônia mesmo na presença de uma camada polimérica fina. Estas interações podem ser minimizadas com o uso de fosfato na fase móvel. Neste caso, as características de retenção do polímero depositado são semelhantes às de suportes alquilsilanos baseados em sílica. A zircônia recoberta com polímero mostrou-se estável em soluções alcalinas. Em contraste com a fase alumina-polibutadieno, zircônia-polibutadieno apresentou estabilidade em fase móvel NaOH 1 mol·L⁻¹ a 100°C.

*Weber et al.*¹⁵ modificaram a superfície de zircônia através da deposição de vapor orgânico de tolueno a altas temperaturas, criando uma camada fina de carbono com mais de 97% da superfície do óxido metálico recoberta. A superfície zircônia/carbono foi modificada quimicamente através da deposição e imobilização de um polímero hidrofóbico, criando uma camada polimérica permanente. As partículas de zircônia/carbono constituem um suporte do tipo fase reversa, mostrando forte retenção de solutos não polares com estabilidade alcalina superior aos suportes de fase estacionária baseados em sílica e alumina. A eficiência cromatográfica foi moderada para solutos como alquilbenzenos, alquilfeniléteres e fenilálcoois e baixa para alquilfenonas e nitroaromáticos. Atribui-se esta baixa eficiência à interações destes solutos com sítios residuais de alta energia na superfície do carbono. A deposição de polibutadieno na zircônia/carbono aumentou a eficiência e a capacidade de carregamento, porém diminuiu a seletividade.

*Kurganov et al.*²³ ligaram covalentemente copolímeros de estireno e vinilsilano à superfície de sílica, alumina e zircônia porosas, com e sem entrecruzamento, após imobilização da cadeia polimérica. A estrutura dos poros foi estudada através da adsorção de nitrogênio e porosimetria de mercúrio, revelando diferentes distribuições de polímero ao longo da superfície modificada e mudanças de porosidade com relação aos óxidos iniciais, dependendo do método de imobilização do polímero. Foi observado que os valores de área superficial, volume de poros e diâmetro de poros reduziram-se pela metade após a modificação da superfície com poliestireno, porém sem alteração da forma e da distribuição do

tamanho dos poros. Compostos básicos foram eluidos em alumina e em zircônia modificadas por ligações covalentes com o copolímero estireno-vinilmetildietoxissilano, com picos simétricos, indicando a ausência de interações não específicas entre a superfície e o soluto. A separação de compostos básicos apresentou boa performance em meio ácido, neutro e alcalino.

*Yu e El Rassi*¹² modificaram a superfície da zircônia microesférica com compostos do tipo octadecilsilano, obtendo-se fases estacionárias octadecil-zircônia monoméricas e poliméricas, através da reação do suporte com octadecildimetilclorossilano e octadeciltriclorossilano, respectivamente. Derivados silanos contendo um ou mais grupos funcionais reativos podem reagir com grupos hidroxila da superfície da zircônia para formar fases ligadas monoméricas ou poliméricas. As fases foram avaliadas, em termos de suas propriedades como fases reversas, com espécies apolares, moderadamente polares e iônicas em várias fases móveis e pH. A fase polimérica apresentou maior retenção que a monomérica, para vários solutos investigados. Estudos de estabilidade, conduzidos em condições extremas de pH (2,0 e 12,0), mostraram que a fase polimérica é mais estável. As fases foram testadas na separação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, oligossacarídeos, dansil-aminoácidos, peptídeos e proteínas.

Em outro estudo¹⁶, os mesmos autores compararam o desempenho de fases estacionárias preparadas a partir de partículas microesféricas de sílica e zircônia recobertas com octadecil, em camadas monoméricas e poliméricas, na separação de aminoácidos. A fase polimérica octadecil-sílica apresentou melhor resolução para os dansil-aminoácidos que a fase monomérica. A separação apresentou complicações adicionais com as fases estacionárias baseadas em zircônia devido à natureza metálica do suporte. Por causa das excessivas interações metálicas, a fase monomérica octadecil-zircônia não apresentou resultados satisfatórios. A magnitude destas interações foi minimizada com o recobrimento da superfície por uma camada C18 polimérica. As fases zirconizadas apresentaram interações soluto-suporte do tipo doador-aceptor de elétrons, predominantemente em pH ácido, responsáveis pela alta retenção de dansil-aminoácidos com propriedades nucleofílicas, como ácido cistéico e ácido aspártico. A presença de pequenas quantidades de íons tartarato e fosfato na fase

móvel reduziu esse tipo de interação, aumentando a resolução da separação. Sob condições ótimas de eluição por gradiente, onze ou quatorze diferentes dansil-aminoácidos puderam ser separados em menos de 6 minutos, respectivamente por fases poliméricas octadecil-zircônia ou octadecil-sílica.

Carr e colaboradores, em seus mais recentes trabalhos publicados²⁴⁻²⁶, focalizaram seus estudos na zircônia porosa recoberta com polibutadieno (PBD). *Reeder et al.*²⁴ estudaram qualitativamente a deposição de PBD nos poros da zircônia, por evaporação, a partir de um solvente volátil. Em pequenos carregamentos (<0,025g PBD/g ZrO₂) ocorreu uma deposição em finas camadas na superfície do suporte, sem preferência de preenchimento de poros pequenos ou grandes. Em carregamentos altos (>0,025g PBD/g ZrO₂) o polímero se deposita preferencialmente em poros pequenos. *Li e Carr*²⁵ estudaram o efeito da temperatura sobre a seletividade, em zircônia-polibutadieno e concluíram que a influência da temperatura na seletividade depende mais das características dos solutos que da fase estacionária. Demonstraram ainda que zircônia-polibutadieno é estável a 100°C durante a passagem de fase móvel até 7000 vezes o volume da coluna.

*Clausen e Carr*²⁷ utilizaram ácido etilenodiamino-N,N'-tetrametilfosfônico (EDTPA), um fosfonato análogo a EDTA, como modificador da superfície da zircônia. Esse material produziu uma fase estacionária "biocompatível", com potencial utilização para separações de proteínas, devido à alta estabilidade química da zircônia.

*Chicz et al.*²⁸ trataram sílica com zircônio e fizeram um estudo comparativo com alumina, magnésia, titânia e sílica. Estes suportes foram recobertos com polietilenoimina (PEI), seguido de entrecruzamento com 1,4-butanodiol digliciléter, com o objetivo de estabilizar a fase. Diferenças na química de coordenação dos átomos da superfície influenciaram a quantidade de PEI adsorvida por unidade de área e a extensão do entrecruzamento. Óxidos de silício, titânio e zircônio (número de coordenação igual a 4) possuem características de adsorção similares entre si e diferentes de magnésio (nº de coordenação 2). Alumina (nº de coordenação 3) tem 37% mais oxigênio na superfície que os outros materiais, adsorvendo maior quantidade do polímero. Apesar da diferença entre os diâmetros de partícula

destes suportes, os tempos de retenção puderam ser comparados para a separação de ovalbumina e albumina bovina. Estudos de estabilidade ao pH confirmaram que titânia, alumina e sílica zirconizada são mais estáveis aos álcalis que a sílica.

*Gushikem e colaboradores*²⁹⁻³² descreveram a modificação da superfície da sílica com zircônio e titânio. *Peixoto et al.*²⁹ propuseram um método de modificação da superfície de sílica porosa com zircônio a partir de reagentes clorados e organofuncionalizados. Este material foi utilizado como extrator de traços de cromo(VI) para determinação espectrofotométrica seletiva desta espécie em meio aquoso. O procedimento utilizando o reagente organo-zircônio resultou em um rendimento maior na deposição de zircônio na superfície da sílica e foi adaptado para este trabalho.

Outros trabalhos de *Gushikem e colaboradores*³⁰⁻³² visaram sintetizar suportes baseados em sílica modificada para estudo como trocadores iônicos e como material utilizado na construção de eletrodos voltamétricos e amperométricos, após a imobilização de complexos inorgânicos em sua superfície.

Métodos de Imobilização de Fases Estacionárias Sorvidas

As preparações de fases estacionárias sorvidas, onde não há reação química, são frequentemente acompanhadas por algum procedimento de imobilização, que lhes conferem maior estabilidade.

Os principais métodos de estabilização utilizados para fases estacionárias sorvidas são o tratamento térmico e a irradiação por microondas, ultravioleta ou raios gama. O método de irradiação por raios gama foi utilizado neste trabalho.

Imobilização de Polímeros com Radiação Gama

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear de alta energia, o que lhe confere um grande poder de penetração e uma alta capacidade de interagir com espécies atômicas ou moleculares³³. É devido a estes fatores e também à ausência de produtos de decomposição do agente iniciador

que a radiação gama tornou-se um catalisador excelente, em forma de energia, para iniciar um processo químico.

As fontes emissoras de radiação gama mais utilizadas contêm os radionuclídeos cobalto-60 e césio-137. Apesar do tempo de meia-vida do césio-137 ser maior que o do cobalto-60, este último é preferido por liberar raios gama mais energéticos³⁴.

Quando a radiação gama incide na matéria ocorrem processos tais como excitação eletrônica e ionização. As moléculas excitadas ou ionizadas podem sofrer cisões ou reagirem com outras espécies, através de radicais livres ou íons, produzindo novas espécies químicas. Assim, os principais efeitos da radiação gama em polímeros são a formação de produtos menores (degradação) e/ou de produtos maiores (entrecruzamento).

No entrecruzamento (*cross-linking*), as cadeias poliméricas são ligadas umas às outras, resultando em estruturas ramificadas de massa molar mais alta e tridimensionais, com propriedades físicas características.

Amostras de poli(dimetilsiloxanos), quando submetidas à doses de radiação gama da ordem de 100kGy, sofrem um aumento de viscosidade³⁵. Segundo *Haken*³⁶, existe uma relação linear entre viscosidade e a massa molar dos poli(alquilsiloxanos). Assim, um aumento da viscosidade implica em um aumento da massa molar das cadeias poliméricas.

O mecanismo de entrecruzamento não está completamente estabelecido e, provavelmente, varia entre os diferentes tipos de polímeros. Os três principais processos sugeridos são³⁷:

1) clivagem de uma ligação C-H em uma cadeia do polímero, seguida da abstração de um segundo átomo de hidrogênio da cadeia vizinha para produzir H₂. As duas cadeias radiculares se combinam para formar a ligação entrecruzada(Figura 3);

2) migração dos sítios de radicais, produzidos por clivagem da ligação C-H, ao longo das cadeias do polímero até os dois ficarem em posições adjacentes para se combinarem e formarem a ligação entrecruzada;

3) reação de grupos insaturados com átomos de hidrogênio, originando radicais poliméricos que se combinam formando a ligação entrecruzada.

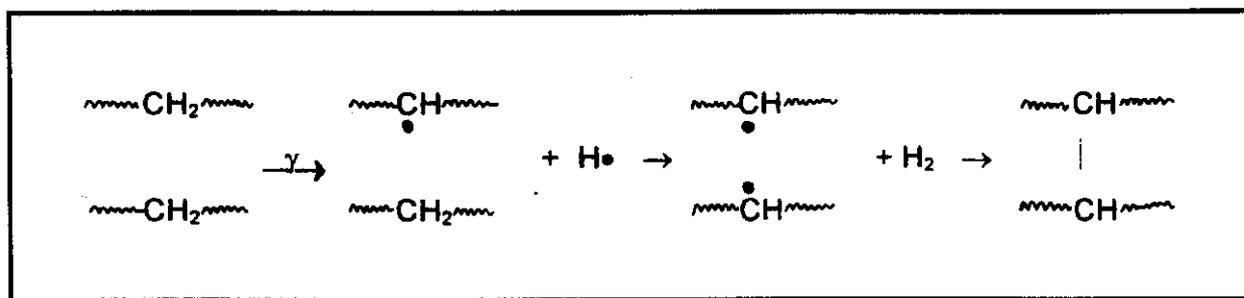


Figura 3: Esquema representativo do entrecruzamento de cadeias poliméricas³⁷

A degradação de um polímero resulta em mudanças em suas propriedades físicas causadas por reações químicas que envolvem cisões na cadeia de polímeros. Estas reações levam à redução na massa molar, isto é, a diminuição do comprimento da cadeia³⁸.

Estudos conduzidos por *Anazawa*^{39, 40}, dentro de nossa linha de pesquisa, mostraram que a imobilização de poli(metiloctilsiloxano) provoca uma melhora significativa dos parâmetros cromatográficos, principalmente quando são utilizadas sílicas irregulares.

Enchimento de colunas

Durante o enchimento de uma coluna cromatográfica busca-se obter colunas estáveis, eficientes e reprodutíveis. Porém existe um grande número de variáveis⁴¹ envolvidas no processo de enchimento (Tabela 1) que tornam crítica esta etapa.

Dois problemas principais devem ser evitados durante o enchimento de colunas⁴²:

a) sedimentação de partículas; acontece quando ocorre uma distribuição não homogênea do tamanho de partículas, resultando em baixa eficiência da coluna;

b) aglomeração de partículas; quando se trabalha com partículas muito pequenas, aumenta a tendência em se acumular forças eletrostáticas na superfície, formando aglomerados que impedem a livre sedimentação das partículas no leito da coluna. O atrito provocado pela alta velocidade de enchimento das

Tabela 1: Variáveis que influenciam no enchimento de colunas⁴¹**1- Características das partículas de recheio**

a) Qualidade do suporte

- tamanho da partícula
- distribuição do tamanho da partícula
- tamanho do poro
- distribuição do tamanho do poro
- densidade da partícula
- forma da partícula (esférica ou irregular)

b) Preparação da fase estacionária

- reagentes de derivatização (mono-, di-, tricloro- ou etoxissilanos)
- reação de derivatização (monomérica ou polimérica)
- capeamento

2- Preparação da suspensão

- fluido de suspensão
- propriedades do solvente
- concentração da suspensão
- temperatura da suspensão

3- Procedimento de enchimento

- pressão
- enchimento ascendente ou descendente
- geometria do reservatório de enchimento
- geometria da saída do reservatório de enchimento

4- Características da coluna

- diâmetro interno
- comprimento
- polimento das paredes do tubo
- porosidade e espessura do filtro

colunas também pode gerar cargas na superfície. A utilização de misturas aquosas na suspensão de enchimento também pode gerar cargas negativas na superfície da sílica, favorecendo a formação de aglomerados.

Os métodos para enchimento de colunas podem ser classificados, de uma maneira global, segundo a forma como se introduz a fase estacionária no tubo. O enchimento a seco é utilizado para se recheiar colunas com partículas de diâmetro maior que $20\mu\text{m}$, enquanto o enchimento por suspensão à alta pressão é preferido para partículas menores que $20\mu\text{m}^1$.

Na técnica de enchimento por suspensão com alta pressão, prepara-se uma suspensão do material de enchimento em um fluido de suspensão. A composição deste fluido de suspensão, que pode ser uma mistura de solventes ou um único solvente, irá definir se o enchimento será por densidade balanceada ou não e se de baixa ou alta viscosidade. A suspensão é colocada em um reservatório e, sob a ação de um solvente propulsor preenche a coluna. O material de recheio é retido por um filtro na extremidade da coluna e é compactado a alta pressão. A pressurização do solvente é feita por uma bomba pneumática movida à gás (N_2), que opera a pressão constante.

O fluido de suspensão tem a função de impedir a aglomeração de partículas, mantendo-as dispersas através da redução da intensidade das forças eletrostáticas de interação, e de impedir a sedimentação das partículas, através da escolha de um solvente ou mistura de solventes com densidade aproximadamente igual à das partículas.

Avaliação de colunas

As colunas cromatográficas recheadas são avaliadas através da análise de parâmetros calculados a partir de medidas obtidas nos cromatogramas.

A figura 4 mostra um cromatograma típico com as principais medidas que podem ser obtidas.

A cromatografia em coluna ocorre com fluxo contínuo da fase móvel até que todos os componentes tenham saído da coluna. Os componentes que vão sendo eluídos passam pelo detector, cuja resposta é indicada graficamente. No

cromatograma, a linha de base representa a passagem somente da fase móvel pelo detector e os picos representam o registro dos componentes eluídos.

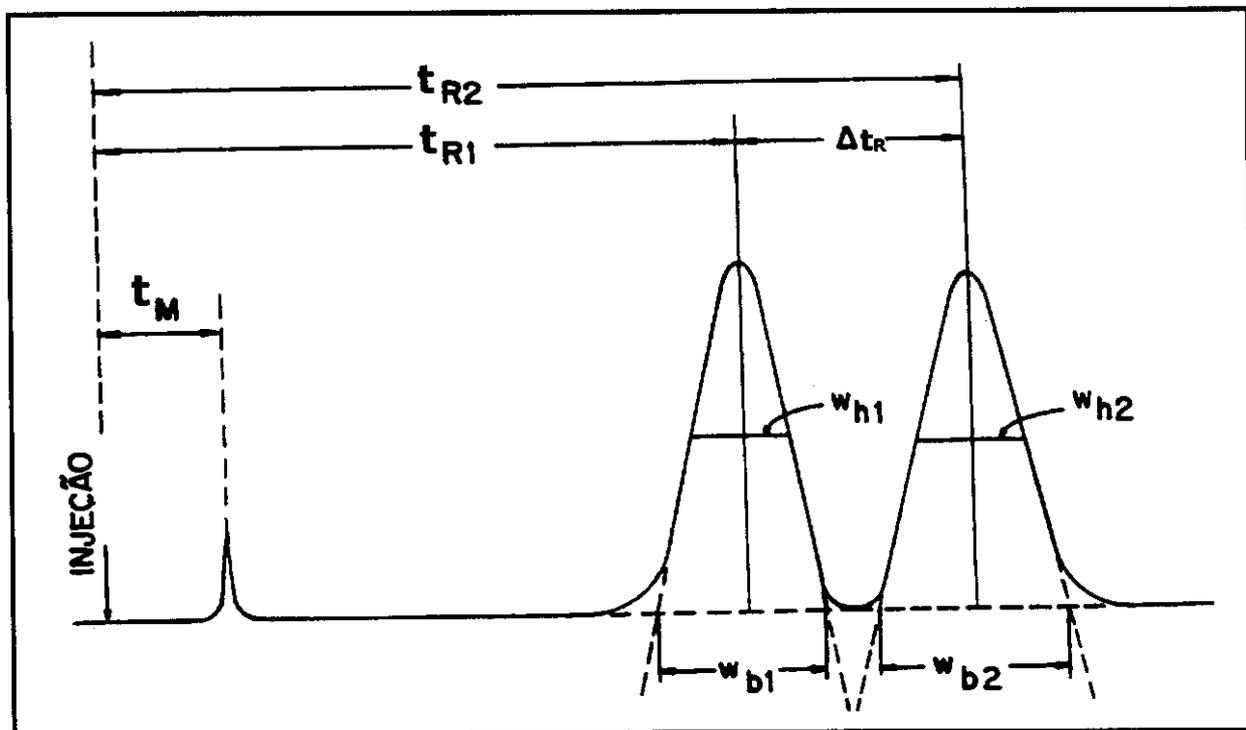


Figura 4: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos

O tempo de retenção de um soluto, t_R , é o tempo gasto desde a injeção da amostra até a saída do componente do sistema. O t_M é o tempo de retenção de um soluto não retido ou tempo de retenção da fase móvel. Tanto t_R quanto t_M podem ser obtidos diretamente do cromatograma quando se utiliza um integrador eletrônico, ou convertendo-se medidas de distância de retenção (d_R ou d_M , respectivamente) para tempo, através da velocidade do papel em registrador potenciométrico. Esta conversão é feita pelas seguintes relações:

$$t_R = \frac{d_R}{f} \quad ; \quad t_M = \frac{d_M}{f} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: f é a velocidade do papel do registrador
 d_R é a distância de retenção do soluto
 d_M é a distância de retenção de um soluto não retido ou da fase móvel

A retenção de um componente é determinada pela razão entre os tempos em que as moléculas ficam retidas na fase estacionária (t'_R) e percorrendo a coluna na fase móvel (t_M) e é representada pelo **fator de retenção (k)**:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde: $t'_R = t_R - t_M$ é o tempo de retenção ajustado

O valor de k , idealmente, deve estar entre 2 e 10, sendo que valores abaixo de 2 significam pouca interação do soluto com a fase estacionária e acima de 10 forte interação e, conseqüentemente, alto tempo de análise¹¹.

O parâmetro que avalia a separação entre dois picos adjacentes é a **resolução (R_s)** e é calculada a partir da diferença entre os tempos de retenção divididos pela média das larguras de suas respectivas bases (w_b):

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde: t_{R1} e t_{R2} são tempos de retenção dos dois picos adjacentes envolvidos no cálculo

w_{b1} e w_{b2} são larguras dos picos na base, em unidades de tempo

w_{h1} e w_{h2} são larguras dos picos à meia-altura, em unidades de tempo

Os valores de R_s acima de 1,5 são considerados ideais, pois indicam uma separação entre os picos até a linha de base.

Outro parâmetro relacionado com a separação de dois picos adjacentes é o **fator de separação (α)**, que é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, segundo a equação 5.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (\text{Eq. 5})$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente, maior será o fator de separação. Porém, apenas o fator de separação pode não ser suficiente para avaliar a separação, pois é uma medida baseada nos tempos de retenção dos máximos dos picos e não considera a largura dos mesmos.

A **eficiência** apresentada por uma coluna é medida em termos de número de pratos, N . Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel e é calculado pela expressão:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 = 5,545\left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2 \quad (\text{Eq. 6})$$

Isto significa que quanto mais estreito for o pico cromatográfico, maior será a eficiência.

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo o tamanho das partículas da fase estacionária, as condições de enchimento da coluna, as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna. Para efeitos de comparação entre colunas, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

O tamanho das partículas de recheio é decisivo para a eficiência das colunas. Os limites de eficiência em função do tamanho das partículas é mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Intervalos de eficiência de colunas disponíveis comercialmente, recheadas com fase reversa porosa ²

Tamanho da partícula (μm)	Intervalos de eficiência (pratos/m)
10	12000 - 20000
5	35000 - 45000
3	80000 - 100000

A expressão para o cálculo do número de pratos só é válida para picos simétricos. Isso faz com que a medida de simetria seja um parâmetro cromatográfico de relevância.

A simetria dos picos é avaliada pelo **fator de assimetria dos picos (A_s)**, a 10% da altura do pico, como mostra a figura 5.

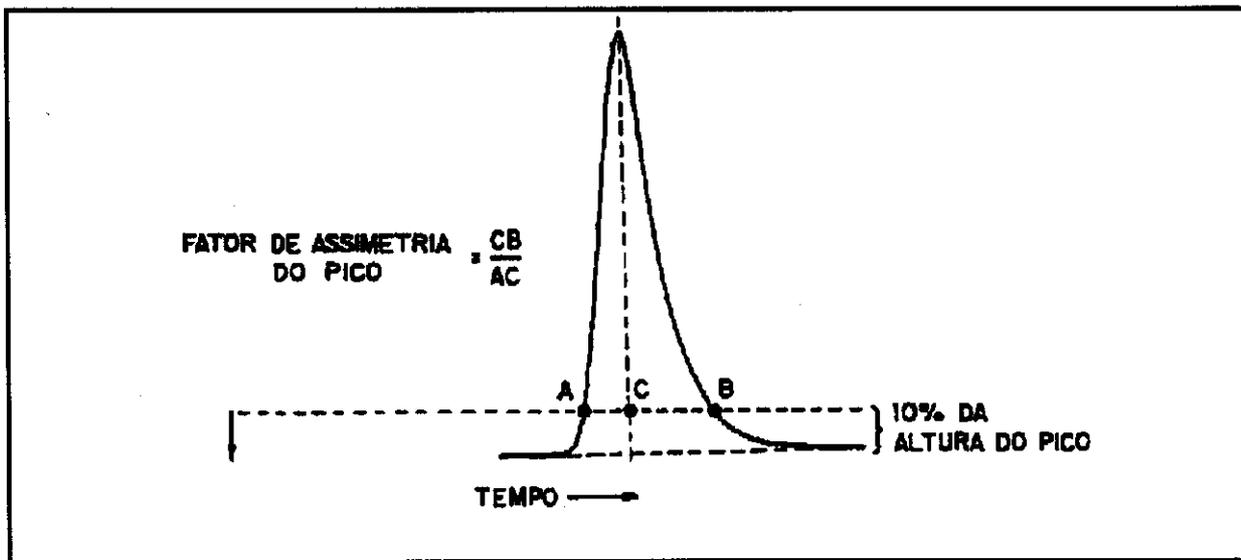


Figura 5: Medida e cálculo do fator de assimetria do pico

O valor de A_s deve estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitidos valores até 1,6⁴³.

A vazão (F) ótima de trabalho pode ser determinada pela equação de van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (\text{Eq. 7})$$

onde: H é a altura de um prato

$\mu = \frac{L}{t_M}$ (Eq. 8) é a velocidade linear da fase móvel,

sendo L o comprimento da coluna

O termo A, difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos, devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Este termo pode ser minimizado usando colunas com diâmetro interno reduzido, bem recheadas e

partículas com tamanho pequeno e uniforme.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. Este termo é mais importante em cromatografia gasosa que em CLAE, já que o coeficiente de difusão no líquido é muito menor que no gás.

O termo C, transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto da fase estacionária para a fase móvel. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for esta espessura, maior será o termo C e menor a eficiência da coluna.

A figura 6 mostra uma curva de van Deemter típica e a contribuição dos termos da equação 7. A curva mostra que existe uma vazão (F) ótima que está diretamente relacionada com a velocidade linear da fase móvel (μ), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência será máxima.

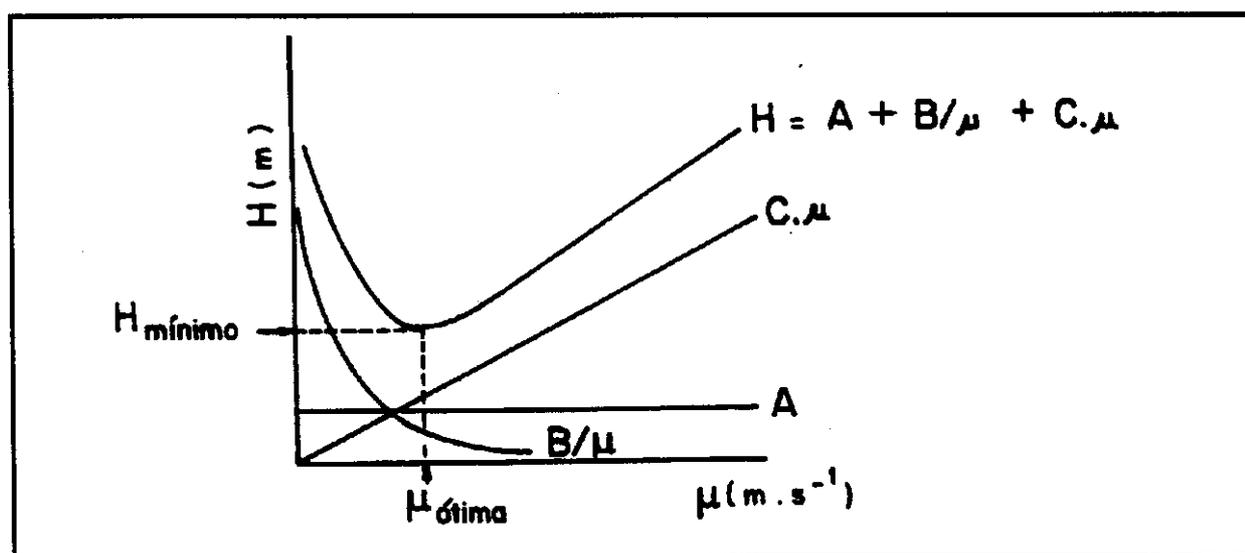


Figura 6: Curva da equação de van Deemter⁴⁴

A completa avaliação de uma coluna cromatográfica passa pela análise de todos os parâmetros citados, com cuidado para que haja coerência entre os parâmetros calculados e o composto que está relacionado a estes dados. Deve-se ainda escolher compostos que caracterizem as propriedades de resolução, de retenção, de seletividade estérica, hidrofobicidade, de troca iônica e de interação silanofílica da coluna cromatográfica⁴⁵.

OBJETIVOS

Este trabalho traz consigo aspectos de continuidade e de inovação.

Ele dá continuidade à linha de pesquisa de desenvolvimento de novas fases estacionárias sorvidas e imobilizadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), cujos trabalhos anteriores^{39, 40, 46-48} utilizaram exclusivamente sílica (de vários tamanhos e formas de partículas) como suporte.

Por outro lado inova pois, junto com outros trabalhos⁴⁹⁻⁵¹, ele propõe a modificação da sílica com um metal de transição, buscando para este novo material características físicas, químicas e cromatográficas que permitam (ou até ampliem) sua utilização como suporte para fases estacionárias reversas para CLAE. Sendo assim, os objetivos deste trabalho podem ser sintetizados em quatro tópicos:

- síntese da sílica zirconizada, através da modificação da superfície da sílica com butóxido de zircônio;
- preparação de fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por meio de radiação gama, para uso em CLAE, a partir do suporte sílica zirconizada e da fase estacionária líquida, poli(metiloctilsiloxano) (PMOS).
- caracterização das fases estacionárias e do suporte através de testes físicos, químicos e cromatográficos.
- estudo da estabilidade química das fases preparadas, através da lavagem com fases móveis neutra e alcalina.

EXPERIMENTAL

*“Se não tentar, certamente
estará fadado ao fracasso.”
(Blaise Pascal)*

Materiais

Reagentes e Solventes

- Acetona P.A., Merck
- Ácido Nítrico P.A., Quimex
- Água deionizada, Sistema Milli-Q, Millipore
- Anilina P.A., Nuclear
- Benzeno P.A., Merck
- Benzonitrila P.A., Riedel-de Haën
- Butóxido de Zircônio (IV) 99,99%, Aldrich
- Cloreto de amônio P.A., ACS
- Clorofórmio P.A., Merck
- Diclorometano para cromatografia, Merck
- N,N-Dimetilanilina P.A., Quimex
- Etanol P.A., Merck
- Hidróxido de amônio P.A., Merck
- Metanol para cromatografia, Mallinckrodt
- Naftaleno P.A., Carlo Erba
- Óxido de Zircônio (IV) 99,99%, Aldrich
- Tetracloreto de Carbono P.A., Merck e Synth
- Tolueno grau espectroscópico, IQ/Unicamp

Gases

- Nitrogênio, Oxigênio do Brasil e Air Liquide

Suporte cromatográfico

- Sílica Gel, Davisil 60; tamanho de partículas: 10 μ m; forma das partículas: irregular; diâmetro de poros: 6nm; Alltech

Fase Estacionária Líquida

- Poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), PS-140, Hüls America (USA)

especificações técnicas:³⁵

- viscosidade (centistokes a 25°C)	600-1000
- massa molar (g·mol ⁻¹)	6200
- gravidade específica (a 25°C)	0,91
- índice de refração (a 25°C)	1,445
- tensão superficial (dina·cm ⁻¹)	30,4

Tubos para colunas cromatográficas

- Tubos de aço inoxidável 316

- Dimensões da coluna:

- Comprimento: 150mm
- Diâmetro interno: 3,9mm

O corpo das colunas cromatográficas e as peças de conexão (figura 7) foram confeccionadas na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP.

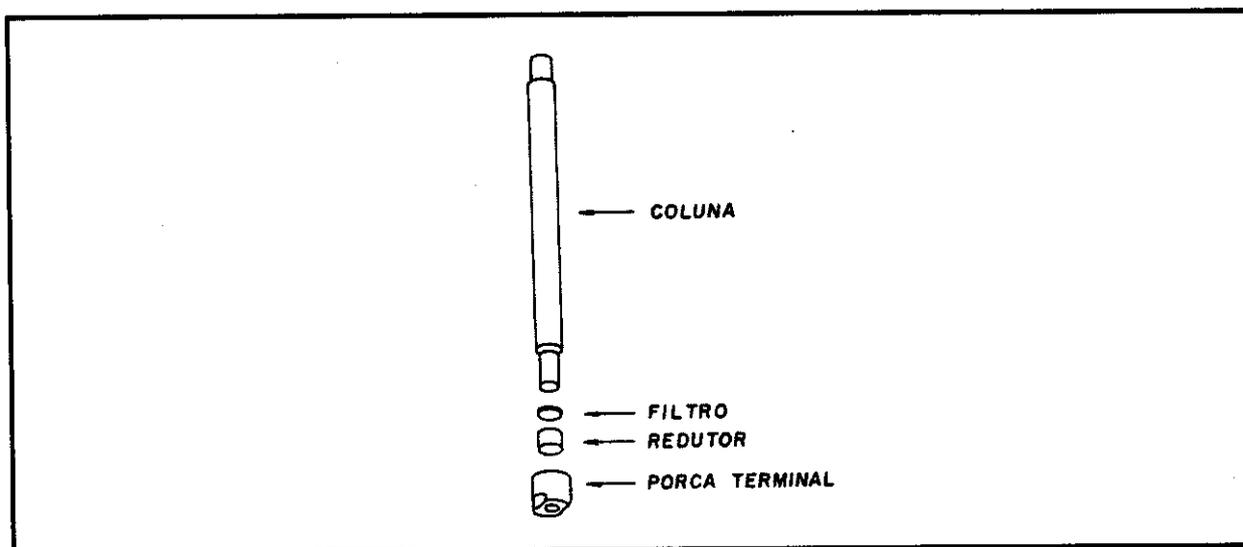


Figura 7: Esquema da coluna cromatográfica e conexões

Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido, composto por:
 - bomba de alta pressão recíproca do tipo pistão cabeça dupla, Waters, mod.510
 - detector espectrofotométrico UV/Vis de comprimento de onda variável entre 190 e 700nm, cela de 14µL de volume, Waters, modelo 481
 - integrador HP, modelo 3395
 - injetor pneumático SSI 3XL, com amostrador de 10µL, modelo 02-0240
- Bomba de enchimento Haskel Inc., com faixa de pressão de 6,9 a 344,8MPa (1000 a 50000psi), modelo 51769
- Ultrassom Thornton, modelo T14
- Agitador mecânico Tecnal Equipamentos de Laboratório
- Agitador rototorque Cole-Parmer Instruments Company, modelo 7637
- Balança analítica Fisher Scientific, modelo A-250
- Sistema Milli-Q Plus, Millipore

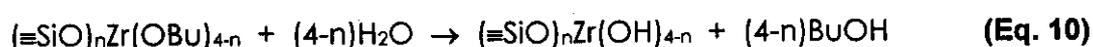
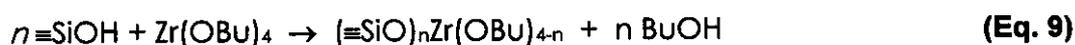
Polimento interno dos tubos para colunas

Os tubos utilizados para a confecção das colunas cromatográficas foram submetidos a um processo de polimento de sua superfície interna, segundo um procedimento desenvolvido por nosso grupo de pesquisas.⁵² O procedimento consiste na passagem através do interior do tubo de aço de uma haste de metal giratória, fixada em uma furadeira de bancada, envolvida em palha de aço e pasta de polimento (Rubbing Compound, nº 7). Após o polimento propriamente, os tubos foram mantidos em repouso em ácido nítrico 30% por 15 horas e, em seguida, lavados sequencialmente com detergente, água, acetona, água deionizada e metanol.



Modificação da superfície da sílica com zircônio

A modificação da superfície da sílica foi realizada através da adaptação de um procedimento desenvolvido por *Gushikem e colaboradores*²⁹⁻³² e em colaboração com o seu grupo de pesquisa. A reação é descrita pelas equações 9 e 10.



onde $\equiv \text{SiOH}$ representa os grupos silanóis da superfície da sílica

Inicialmente ocorre a ligação de butóxido de zircônio aos grupos silanóis, com liberação de BuOH. Em seguida, é feita a hidrólise para eliminação dos íons butóxido da superfície.

Em um sistema de refluxo composto por um balão de três bocas, um condensador e um agitador mecânico, foram introduzidos 70g de sílica previamente seca em estufa a 150°C durante 8 horas e 300mL de tolueno previamente destilado e seco com fitas de sódio. A agitação foi acionada e uma corrente de gás inerte (N₂) foi acoplada ao sistema a fim de se evitar a presença de umidade durante a reação. Adicionaram-se aproximadamente 35mL de butóxido de zircônio (IV), tomando extremo cuidado na manipulação deste reagente, devido a sua alta toxicidade e fácil decomposição frente à umidade do ambiente. A quantidade do reagente de zircônio foi definida de forma a se obter uma relação aproximada de 1,5mmol de Zr para 1g de sílica. A elevada instabilidade do reagente de zircônio exigiu que a sua manipulação fosse rápida; portanto, o volume foi medido com baixa exatidão. Foram utilizados aproximadamente 45mL de butóxido de zircônio para 70g de sílica em cada uma das três preparações realizadas. Sempre sob atmosfera inerte, o sistema foi mantido em refluxo por 12 horas.

A segunda etapa da preparação da sílica zirconizada consistiu na lavagem, por decantação, do material parcialmente modificado com tolueno, por três vezes, procurando sempre evitar a exposição excessiva à umidade do ambiente.

Após a última lavagem, o sólido foi filtrado através de uma membrana de Teflon Millipore (0,22 μ m), sob vácuo. O material retido foi lavado duas vezes com tolueno (200mL) e com clorofórmio (200mL) e seco, por evaporação do solvente, à temperatura ambiente.

A terceira e última etapa da preparação correspondeu a hidrólise dos resíduos orgânicos da superfície. Após secagem em estufa a 100°C por 45 minutos, o sólido foi imerso em 500mL de ácido nítrico 1.10⁻⁴mol.L⁻¹. Depois de decantado o sólido, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se mais uma quantidade de ácido. Em seguida realizou-se uma filtração, lavando-se a sílica zirconizada com água deionizada e etanol. O material final foi seco em estufa a 100°C por 45 minutos e estocado em dessecador.

Esta preparação foi realizada para três lotes de 70g de sílica, procurando-se reproduzir ao máximo as condições de preparação. As análises realizadas (fluorescência de raios-X, espectroscopia no infravermelho, análise elementar, área superficial específica, densidade, termogravimetria) indicaram, como será discutido adiante, que houve reprodutibilidade nas preparações.

Preparação das Fases Estacionárias

O recobrimento do suporte cromatográfico com a fase líquida C-8, poli(metiloctilsiloxano) - (PMOS), foi realizado através da adição lenta do suporte (sílica não modificada ou sílica zirconizada) em uma solução contendo o polímero dissolvido em diclorometano (CH₂Cl₂). Essa solução ficou sob agitação durante 3 horas, seguindo-se da evaporação do solvente e ficando a fase líquida sorvida na superfície do suporte. O diclorometano foi escolhido como solvente, porque nele o polímero apresenta uma alta solubilidade, além de ser um solvente volátil, o que agiliza a sua eliminação.

O procedimento consistiu inicialmente na definição da quantidade de PMOS a ser depositada sobre o suporte, através da relação massa/massa. Em seguida, o polímero foi dissolvido na proporção de 1g de fase estacionária (polímero + suporte) para 12mL de diclorometano. A sílica não modificada, ou sílica zirconizada dependendo da preparação, foi adicionada lentamente à solução polimérica e

mantida sob agitação durante 3 horas. A mistura foi transferida para uma placa de Petri grande (14cm de diâmetro e 1,5cm de altura) e o solvente foi então evaporado.

Com base em trabalhos anteriores de *Anazawa e Jardim*⁴⁶, realizados com sílica não modificada, em nossa pesquisa foram feitos carregamentos de 40 e 50% (m/m) de PMOS em relação à quantidade total de fase estacionária preparada. O suporte foi aquecido previamente em estufa a 150°C por 22 horas.

Vários problemas foram enfrentados com a preparação das fases estacionárias. Após vários estudos, concluiu-se que o ambiente de evaporação do solvente exerce um papel decisivo no resultado final do material preparado. Por ambiente de evaporação entenda-se as condições do fluxo de ar que passa pelo recipiente de reação, o quão plana é a superfície na qual está depositado o material e a relação entre quantidade de material e área do recipiente onde ocorre a evaporação. Concluiu-se que é desejável, e até necessário, que a evaporação do solvente aconteça o mais rapidamente possível. Para isso contribuem fatores como: a eficiência do sistema de exaustão da capela onde ocorre a evaporação, uma superfície apropriada para deposição do material e uma quantidade adequada de material para a superfície escolhida.

O procedimento para preparação das fases estacionárias sorvidas foi aperfeiçoado; a principal modificação foi a redução da quantidade de material preparada, de 10 ou 15g utilizados anteriormente, para 4g por lote.

Caracterização do PMOS, do suporte e das fases estacionárias

A fase líquida, PMOS, foi analisada por cromatografia de permeação em gel (GPC) e espectroscopia no infravermelho. Os suportes foram caracterizados por fluorescência de raios-X, análise elementar de carbono, espectroscopia no infravermelho, área superficial específica, análise termogravimétrica (ATG) e medida de densidade. As fases estacionárias preparadas foram avaliadas através de análise elementar de carbono, espectroscopia no infravermelho e análise

termogravimétrica (ATG). Para realização destas análises foram utilizados os serviços do Instituto de Química da Unicamp.

Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A verificação das características do polímero PMOS (massa molar e polidispersividade) foi realizada utilizando a cromatografia de permeação em gel. Empregaram-se colunas Ultrastyrigel 10³, 10⁴, 10⁵, de 7,8 x 300mm. Foram injetados 250µL de amostra dissolvidos em tolueno, que também foi usado como fase móvel a uma vazão de 1,0mL·min⁻¹ e à temperatura de 40°C, tanto para a coluna quanto para o detector de índice de refração.

Fluorescência de raios-X

A extensão da modificação da superfície da sílica com zircônio foi avaliada pela quantidade de Zr na superfície, determinada através de fluorescência de raios-X. A curva analítica utilizada foi obtida a partir do óxido de zircônio(IV), em uma faixa de concentração de 0,5 a 20% de Zr. O aparelho utilizado foi um espectrômetro de fluorescência de raios-X Tracer X-Ray, modelo Spectrace 5000.

Análise elementar de carbono

A análise elementar foi aplicada às amostras de sílica não modificada, sílica zirconizada, fases estacionárias preparadas e recheios de algumas colunas após enchimento e uso, com o objetivo de avaliar, respectivamente, o teor de resíduo de carbono nos suportes, a quantidade de carbono sorvida sobre eles e a quantidade de carbono não arrastado após o enchimento das colunas sob alta pressão. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO₂, que é então medido em função de sua condutividade térmica. O aparelho utilizado foi um analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400.

Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi aplicada ao polímero, à sílica, à sílica zirconizada e à sílica zirconizada com PMOS sorvido, com o objetivo de avaliar

qualitativamente o grau de recobrimento pelo PMOS dos grupos hidroxilas da sílica zirconizada, através da presença de bandas características destes grupos funcionais.

Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 400 cm^{-1} , em um espectrofotômetro de infravermelho Perkim Elmer, modelo FT-IR 1600. O espectro do poli(metiloctilsiloxano) foi obtido a partir de um filme em cela de cloreto de sódio, enquanto que para as fases estacionárias os espectros foram obtidos pela prensagem da amostra, sob a forma de pastilhas, com brometo de potássio.

Área superficial específica (A_{BET})

A área superficial específica expressa uma medida de área em relação à massa do material ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Foi utilizado o método de BET (Brunauer, Emmett e Teller), que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diferentes pressões, na temperatura do nitrogênio líquido. O aparelho utilizado foi um medidor de área superficial Micromeritics, Flowsorb II, modelo 2300.

Análise termogravimétrica (ATG)

Amostras de sílica não modificada e de sílica zirconizada e de fases estacionárias foram encaminhadas para análise termogravimétrica com o objetivo de avaliar suas estabilidades térmicas. O princípio da técnica se baseia em um analisador térmico (analisador termogravimétrico TA Instruments, modelo TGA-2050) onde, através de uma microbalança, se obtém a porcentagem de perda de massa da amostra em função do aumento da temperatura. A análise é realizada sob atmosfera de argônio, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, no intervalo de 25 a 900 $^{\circ}\text{C}$.

Densidade

As medidas de densidade da sílica não modificada e da sílica zirconizada foram realizadas através da utilização de um picnômetro eletrônico (Micrometer Picnometer 1305). O princípio de funcionamento deste equipamento está na medição da diferença entre o volume da cela de amostra vazia e carregada,

através da introdução de um gás inerte (hélio ou nitrogênio), sob pressão controlada.

Avaliação Cromatográfica

A avaliação cromatográfica consistiu na análise de parâmetros cromatográficos calculados a partir de medidas realizadas nos cromatogramas obtidos para as colunas recheadas com as fases estacionárias preparadas. Os parâmetros calculados foram eficiência (N/m), fator de assimetria (A_s), fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α).

Foram testadas duas misturas-teste. A mistura I, composta por acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno, avaliou o comportamento das colunas na separação de compostos neutros de várias polaridades. A mistura II, composta por anilina e N,N-dimetilanilina, avaliou as colunas em termos da separação de compostos básicos.

As misturas-teste foram preparadas qualitativamente, em concentrações tais que os picos nos cromatogramas apresentassem alturas semelhantes e que necessitasse de uma baixa atenuação no integrador. Para que houvesse o registro do sinal relativo a fase móvel, os componentes da mistura teste foram diluídos em 40mL de metanol e o volume foi completado com a fase móvel até 100mL. A mistura foi armazenada sob refrigeração.

As fases móveis utilizadas foram preparadas a partir da mistura metanol:água, nas proporções 70:30 (v/v) para a mistura I e 60:40 (v/v) para a mistura II. Estas fases móveis, amplamente utilizadas em nosso laboratório em pesquisas com fases estacionárias reversas, têm a vantagem de ser composta por solventes de baixa toxicidade e baixo custo. Antes da preparação de cada lote de fase móvel, os solventes foram filtrados em membrana de Teflon de 0,22 μ m (Millipore) e desgaseificados em ultrassom por aproximadamente 10 minutos. A medida de t_m (tempo de retenção da fase móvel) foi obtida a partir do pico do metanol.

Enchimento de colunas

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

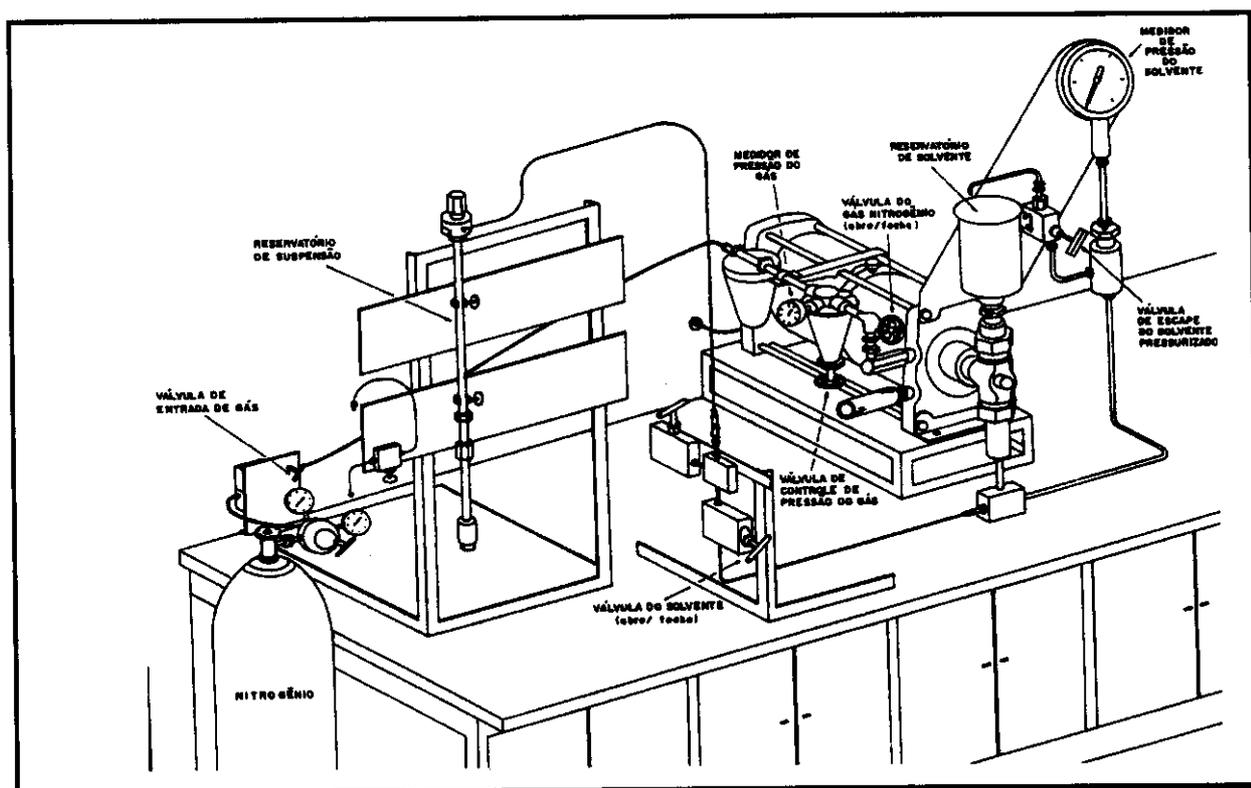


Figura 8: Esquema do sistema de enchimento

Antes de se iniciar o procedimento de enchimento, todo o sistema é passado por uma vistoria, a fim de que se certifique que não há vazamentos na linha e nem a presença de resíduos no interior do reservatório de suspensão e nas conexões. Vazamentos podem gerar variação da pressão durante o enchimento, causando um enchimento não homogêneo da fase estacionária que, junto com resíduos de outros materiais, resultam em perda de eficiência da coluna preparada.

O procedimento de enchimento de colunas cromatográficas utilizando o sistema Haskel consiste em preencher o reservatório de solvente com metanol,

previamente filtrado, e o reservatório de suspensão com a fase estacionária suspensa em tetracloreto de carbono na concentração desejada (as suspensões foram mantidas sob agitação constante, em um agitador tipo roto-torque, durante 15 horas) e pressurizar o sistema a uma pressão fixada. A pressão exercida pelo gás força a passagem do solvente de suspensão (CCl_4) e depois do solvente propulsor (MeOH) pela fase estacionária, que fica retida graças a presença de um filtro ao final da coluna. A pressão constante durante o enchimento irá resultar em um leito bem compactado e homogêneo, ideal para as separações cromatográficas.

O sistema é mantido sob pressão até se coletar 80mL de solvente e em seguida são aplicados mais três pulsos de 20 segundos cada para se obter um melhor assentamento da fase estacionária no leito da coluna. Após o enchimento, o sistema é despressurizado e a coluna é desconectada da linha.

Condicionamento de colunas

As colunas enchidas foram submetidas a um condicionamento antes da sua utilização, para que ocorresse um equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel, evitando problemas operacionais como flutuação na linha de base e não reprodutibilidade dos tempos de retenção dos compostos eluídos. O condicionamento foi realizado durante 4 horas com a fase móvel a ser utilizada nas separações e a uma vazão de $0,2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Antes do início das análises, a cada dia, foi realizado um condicionamento da coluna de 20 a 30 minutos.

Definição da vazão de trabalho

A vazão de trabalho foi definida com base nas curvas de van Deemter, obtidas para algumas colunas que apresentaram boa eficiência. Para obtenção das curvas de van Deemter foram registrados cromatogramas em várias vazões de fase móvel. Os valores de eficiência da coluna foram plotados no eixo das ordenadas como altura de um prato (H), que nada mais é do que o inverso do número de pratos por metro (N/m); no eixo das abcissas foram plotados valores de velocidade linear da fase móvel (μ), definida pela equação 8. Esta otimização se

baseia no fato de que existe uma vazão ótima onde a coluna irá apresentar uma eficiência máxima, identificada pelo mínimo das curvas.

Otimização do carregamento de PMOS

Para o estudo de otimização de PMOS foram preparados lotes de fases estacionárias sorvidas com carregamentos de 40 e 50% (m/m). Com cada lote de fase estacionária foram recheadas 2 colunas, mantendo-se fixos os outros parâmetros envolvidos no processo: o próprio procedimento de preparação das fases estacionárias, técnica de preparação das suspensões de enchimento, procedimento para enchimento das colunas, condicionamento das colunas e condições cromatográficas. O valor otimizado de carregamento de PMOS foi definido com base na avaliação cromatográfica, observando o valor que resultasse em colunas com maior eficiência, menor assimetria dos picos e resolução aceitável.

Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento

Uma vez otimizado o valor de carregamento de PMOS (50%), realizou-se a otimização dos parâmetros concentração de suspensão e pressão de enchimento.

Para este estudo foram preparados 4 conjuntos de colunas (em duplicata) com as características apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Valores utilizados para a otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento

colunas	concentração da suspensão (%m/v)	pressão de enchimento (MPa / psi)
A, B	10	34,5 / 5000
C, D	10	48,3 / 7000
E, F	20	34,5 / 5000
G, H	20	48,3 / 7000

Irradiação de fases estacionárias

Dois lotes de fases estacionárias sorvidas com carregamento de 50% PMOS foram selados em ampolas de vidro pirex, sob condições ambientes, e enviados à empresa IBRAS-CBO para irradiação. Foi utilizada a radiação gama, proveniente de fonte de Cobalto-60, nas doses de 80 e 120kGy, que correspondem aos melhores valores obtidos por *Anazawa e Jardim*⁴⁶.

Estas fases irradiadas foram utilizadas no enchimento de colunas para avaliação da influência da irradiação no seu desempenho cromatográfico.

Teste de estabilidade em fase móvel neutra

Colunas com fases estacionárias à base de sílica não modificada, de sílica zirconizada e de sílica zirconizada e irradiada foram submetidas ao teste de estabilidade, a fim de se avaliar a evolução do comportamento cromatográfico com a passagem de fase móvel pela coluna e durante sucessivas injeções da mistura I.

Passou-se fase móvel MeOH:H₂O (70:30 v/v) a uma vazão de 0,8mL.min⁻¹ através das colunas cromatográficas até uma quantidade equivalente a 5000 vezes o volume da coluna. Definiu-se "*volume de coluna*" (V_c) através da equação 11. Esta expressão também é definida, pela IUPAC, como *voluma de fase móvel* (V_M).

$$V_c = F \cdot t_M \quad (\text{Eq. 11})$$

onde,

F= vazão da fase móvel

t_M = tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária (este valor foi tomado como valor médio de 3 injeções)

Após a passagem de fase móvel, em intervalos de volume pré-estabelecidos, condicionava-se a coluna por 15 a 20 minutos com a mesma fase móvel, na vazão a ser utilizada na análise (0,2mL.min⁻¹) e fazia-se a eluição da mistura I. Através desta análise obtinham-se os dados de eficiência, fator de assimetria, fator de retenção, resolução e de fator de separação, com os quais as colunas foram avaliadas. Foram traçados gráficos de eficiência, retenção e resolução vs. volumes de coluna.

Teste de estabilidade em fase móvel alcalina

A fim de se estudar o comportamento das fases estacionárias preparadas frente a condições adversas de trabalho, colunas com recheio a base de sílica não modificada e de sílica zirconizada irradiada foram submetidas ao mesmo teste de estabilidade descrito no item anterior, porém utilizando-se como fase móvel a mistura metanol:solução aquosa $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, pH 10 (70:30 v/v). Neste caso, antes da análise, a coluna foi condicionada durante 15 a 20 minutos com a fase móvel MeOH:H₂O (70:30 v/v).

Teste com Mistura Básica

A mistura básica (mistura II) testada foi: anilina, N,N-dimetilanilina.

A mistura II tem a finalidade de avaliar as interações entre fase estacionária e compostos básicos. Os componentes dessa mistura são também utilizados na avaliação de colunas comerciais.

Para análise desta mistura foi utilizada fase móvel MeOH:H₂O 60:40 (v/v), a uma vazão 0,5mL·min⁻¹. Foram testadas colunas com recheios de PMOS a base de sílica não modificada, sílica zirconizada sorvida e sílica zirconizada irradiada.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

*“O real não está na saída nem na
chegada; ele se expõe para
a gente é no meio da travessia.”
(João Guimarães Rosa)*

Modificação da superfície da sílica com zircônio

Caracterização do suporte

Foram preparados três lotes de sílica zirconizada (SiZrI, SiZrII e SiZrIII), cujos resultados das análises de caracterização são apresentados nas tabelas 4 a 8 e nas figuras 9 e 10.

Fluorescência de raios-X

Tabela 4: Teor de zircônio nos suportes preparados

Suporte*	% Zr	mmol Zr/g de sílica
SiO ₂	0,00	0,00
SiZr I	15,2	1,66
SiZr II	14,0	1,53
SiZrIII	16,7	1,83

* SiZr I, II e III : sílica zirconizada, primeira, segunda e terceira preparações, respectivamente

Análise elementar de carbono

Tabela 5: Análise elementar de carbono para sílica não modificada e sílica zirconizada

Suporte*	% C
SiO ₂	0,19
SiZr I	1,29
SiZr II	1,69
SiZrIII	1,10

* SiZr I, II e III : sílica zirconizada, primeira, segunda e terceira preparações, respectivamente

Área superficial específica (A_{BET})

Tabela 6: Área superficial específica (A_{BET}) de sílica não modificada e sílica zirconizada

Suporte*	A _{BET} (m ² .g ⁻¹)
SiO ₂	387
SiZr I	367
SiZr II	351
SiZr III	370

* SiZr I, II e III : sílica zirconizada, primeira, segunda e terceira preparações, respectivamente

Densidade

Tabela 7: Densidade de sílica não modificada e sílica zirconizada a 22°C

Suporte	densidade (g·mL ⁻¹)
SiO ₂	2,157
SiZr I	2,008
SiZr II	1,978
SiZr III	2,359

* SiZr I, II e III : sílica zirconizada, primeira, segunda e terceira preparações, respectivamente

Análise termogravimétrica (ATG)

Tabela 8: Análise termogravimétrica dos suportes

Suporte	% perda de massa (%)	ΔT de perda de massa (°C)
SiO ₂	2,7	290,0 - 623,1
SiZr I	4,5	294,5 - 477,8
SiZr II	4,3	348,3 - 464,1
SiZr III	2,9	324,6 - 432,6

* SiZr I, II e III : sílica zirconizada, primeira, segunda e terceira preparações, respectivamente

Os resultados apresentados nas tabelas 4-8 mostram uma concordância muito boa, o que atesta a reprodutibilidade na preparação do suporte cromatográfico.

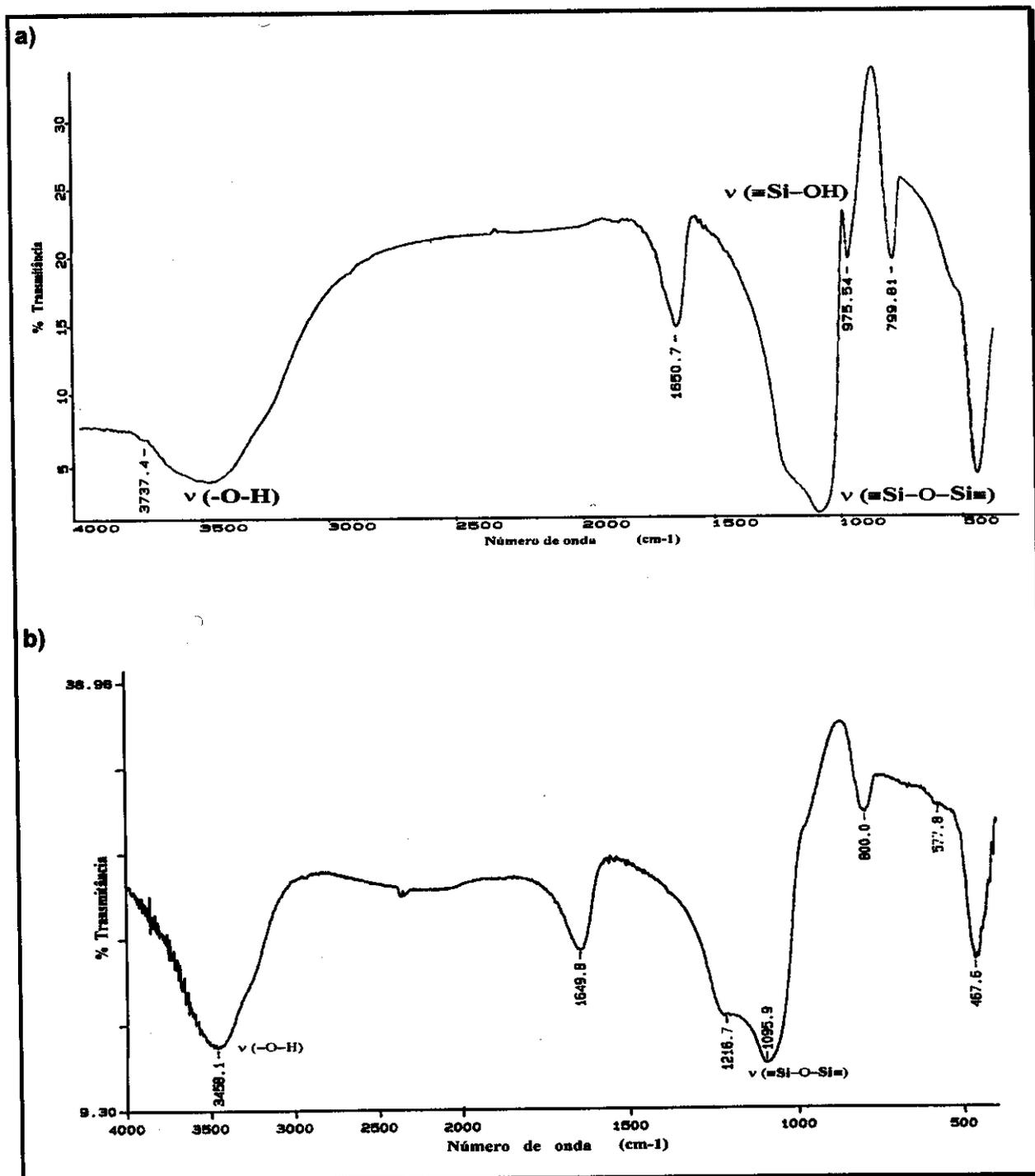
Os resultados de fluorescência de raios-X (Tabela 4) dão uma informação a respeito da quantidade de zircônio presente em todo o material analisado; logo, não é uma medida de superfície. A partir desses resultados é possível dizer que a reação de zirconização é reprodutível, em termos da quantidade de zircônio adicionado à sílica. É também uma reação eficiente, uma vez que a mesma reação, com titânio⁶⁰, incorpora cerca de 3,8% de titânio na sílica e a reação com zircônio incorpora em média 15,3% do metal.

A pequena quantidade de carbono, detectada através da análise elementar (Tabela 5), é provavelmente relativa a resíduos de material orgânico do reagente butóxido de zircônio utilizado na reação de zirconização e não eliminado completamente durante a etapa de hidrólise.

A ligeira redução em área superficial (Tabela 6) das sílicas zirconizadas em relação à sílica não modificada ocorre possivelmente devido ao bloqueio dos poros mais finos da matriz pelo reagente adicionado. Esse comportamento é evidenciado pelos dados das tabelas 4 e 5, onde se observa um decréscimo de área superficial com a diminuição da quantidade de zircônio e com o aumento do resíduo de carbono, respectivamente.

Não se verifica uma mudança muito grande de densidade (Tabela 7) entre sílica não modificada e sílica zirconizada, porém pode-se observar que a variação de densidade entre os lotes de sílica zirconizada acompanha exatamente à variação na área superficial (Tabela 6) e na quantidade de zircônio apresentada pela análise de fluorescência (Tabela 4) e ao inverso da variação de porcentagem de carbono (Tabela 5), o que comprova a mudança de densidade ocasionada pela introdução do metal na sílica e a consequente diminuição do resíduo de carbono, alterando também a área superficial.

As análises termogravimétricas (ATG) (Tabela 8) mostraram uma perda muito pequena de massa à elevada temperatura e indicam uma boa estabilidade térmica do suporte. O fato de que a maioria das análises em CLAE são conduzidas à temperatura ambiente ou, no máximo, à 90°C, contribui para que este suporte não apresente problemas quanto à estabilidade térmica. Ocorre também uma perda de massa, que acontece até 100°C (Figura 10), que se deve à perda de umidade do material.

Espectroscopia no infravermelhoFigura 9: Espectros no infravermelho de a) SiO_2 e b) SiZrIII

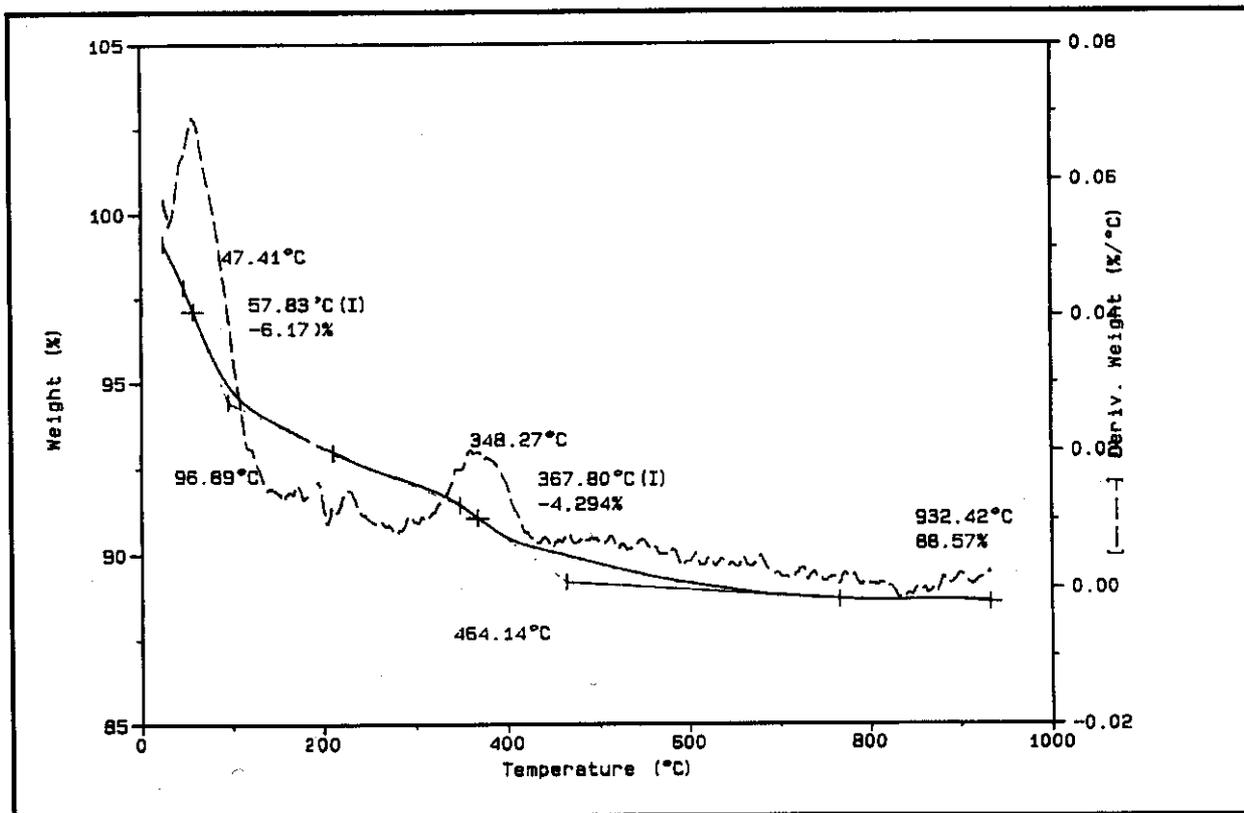


Figura 10: Termograma de sílica zirconizada (SiZrII)

As principais bandas dos espectros de IV da sílica não modificada (Figura 9a) podem ser atribuídas ao estiramento (ν) de grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e à grupos hidroxilas geminais (3500cm^{-1}), grupos siloxanos (1100cm^{-1}), grupos silanóis livres (ombro em 975cm^{-1}). Os espectros IV da sílica zirconizada (Figura 9b) apresentam as mesmas bandas da sílica não modificada, com exceção do sinal em 975cm^{-1} , que praticamente não pode ser observado por causa da modificação dos grupos silanóis livres.

Caracterização do poli(metiloctilsiloxano) - PMOS

As análises de IV (Figura 11) e a cromatografia de permeação em gel (GPC) (Figura 12) do polímero puro tiveram como objetivo constatar sua integridade e pureza para a preparação das fases estacionárias tipo reversa.

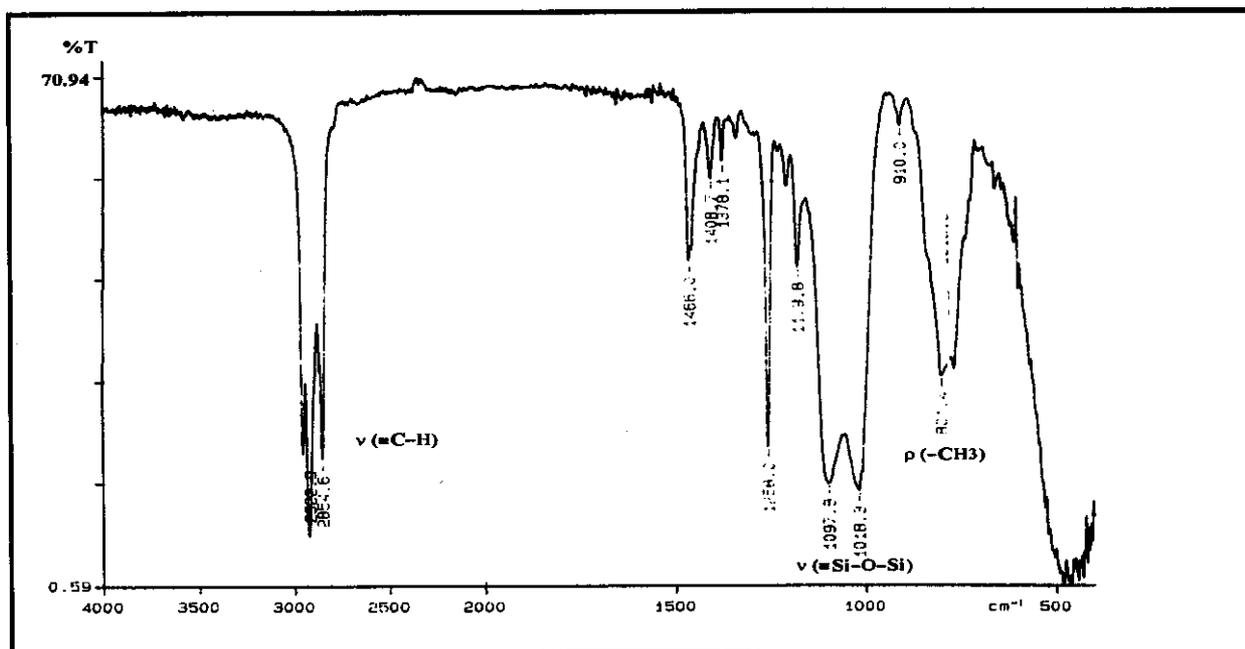


Figura 11: Espectro no infravermelho do PMOS

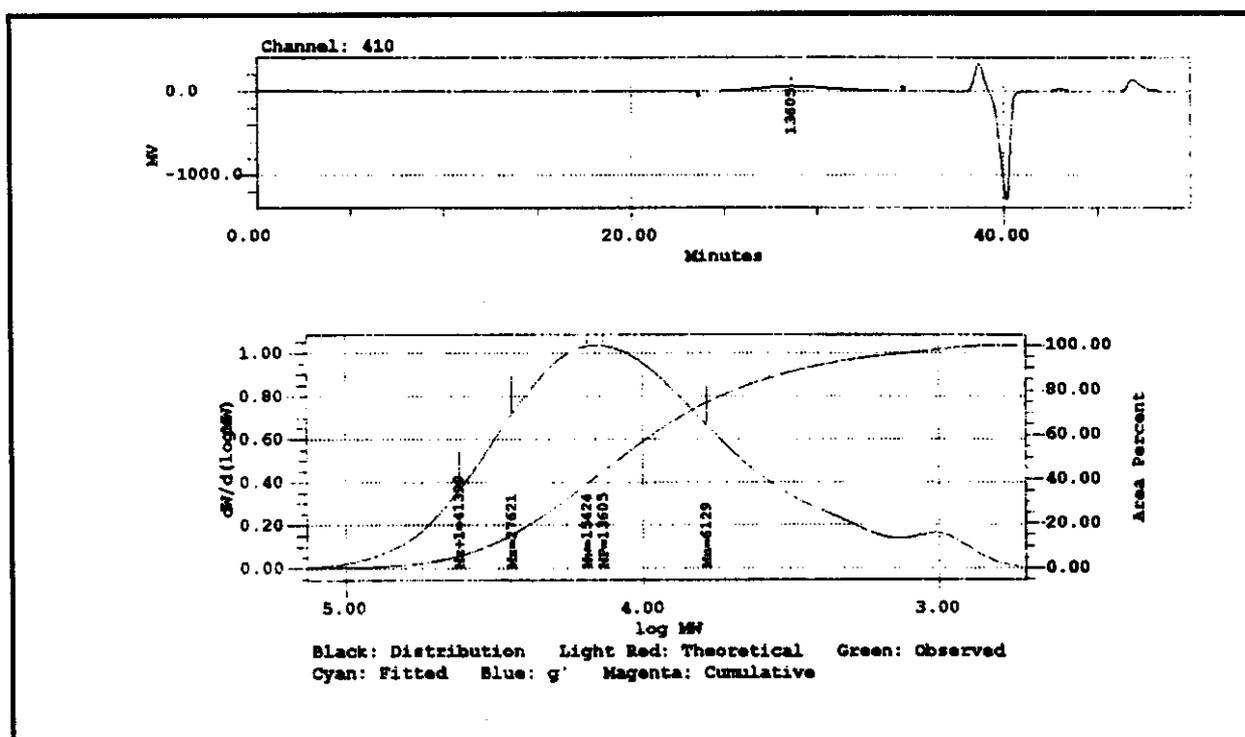


Figura 12: Cromatograma de permeação em gel do PMOS. Coluna Ultrastyrigel 7,8 x 300 mm. Condições Cromatográficas: F.M.: tolueno; vazão: 1,0mL·min⁻¹; Temperatura da coluna e detector: 40°C.

O espectro no infravermelho (Figura 11) mostrou ausência de umidade, que seria indicada por uma banda larga na região de 3500cm^{-1} , atribuída ao estiramento (ν) dos grupos hidroxilas. As principais bandas são um triplete, em 2900cm^{-1} , relativo ao estiramento (ν) dos grupos metila e um duplete largo em 1100 e 1030cm^{-1} relativo ao estiramento (ν) dos grupos siloxanos. A banda em 801cm^{-1} é relativa à deformação assimétrica (ρ) dos grupos metilas.

A cromatografia de permeação em gel (Figura 12) indicou massa molar média (M_n) de $6168\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e polidispersividade de 2,52. O valor de M_n está concordante com o valor de catálogo³⁵ de $6200\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A figura 12 mostra o cromatograma de GPC do PMOS e a expansão do pico de massa molar alta, que corresponde ao pico mais largo, no qual são calculados os valores de massas molares médias.

Enchimento de colunas

Neste trabalho foram preparadas algo em torno de 50 colunas cromatográficas. O procedimento de enchimento de colunas cromatográficas é pouco reproduzível, pois está sujeito a uma série de variáveis (Tabela 1). Colunas preparadas comercialmente⁵³ com partículas de $5\mu\text{m}$ e fase C-18, resultam em eficiências que variam entre 65000 e 80000 pratos/metro, utilizando o mesmo procedimento de enchimento.

Para certificação da confiabilidade dos resultados, realizou-se a maioria dos enchimentos em duplicata. Comparando-se os dados das análises, pôde-se ter um indicativo da ocorrência de eventuais falhas no enchimento. As colunas com resultados muito discrepantes foram descartadas e novamente recheadas.

O procedimento de enchimento de colunas ocasiona um arraste de PMOS que varia da ordem de 50 até 70% do carregamento inicial. A quantidade de polímero presente no recheio após o enchimento das colunas pode ser inferida através de dois métodos:

- I) pesagem do PMOS arrastado durante o enchimento;
- II) análise elementar de carbono do material residual de enchimento.

Pelo método I, o carregamento final de PMOS é calculado pela fórmula:

$$\%PMOS = \left(\frac{(m_P)_i - (m_P)_p}{((m_P)_i - (m_P)_p) + m_s} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

onde: $(m_P)_i$ é a massa inicial de polímero
 $(m_P)_p$ é a massa de polímero arrastado
 m_s é a massa do suporte

O valor de $(m_P)_p$ foi obtido por evaporação da solução recolhida do enchimento da coluna, restando o polímero.

Pelo método II, a quantidade de PMOS é calculada a partir dos valores de porcentagem de carbono. Sabendo-se que 62% da massa de PMOS é referente a carbono, tem-se a relação direta:

$$m_{PMOS} = \frac{m_C}{0,62} \quad \text{ou} \quad \%PMOS = \frac{\%C}{0,62} \quad (\text{Eq.13})$$

O cálculo, realizado por ambos os métodos, mostrou-se concordante. O carregamento de PMOS após o enchimento oscilou entre 13 e 24% de PMOS, ou 8,1 a 15% de carbono, segundo os resultados de análise elementar de carbono realizada com o material residual do enchimento de colunas. O valor de porcentagem de carbono encontrado para a maioria das colunas comerciais de fase reversa C-8 está na faixa de 10 a 15%⁵⁴.

Em face desses resultados, é muito comum que se pergunte por que o carregamento inicial de polímero já não é definido entre 15 e 20%, evitando-se um excesso, supostamente exagerado, no carregamento de PMOS. *Anazawa*³⁹ concluiu que os enchimentos realizados com baixo carregamento de PMOS (10 e 20%), resultam em colunas com baixa eficiência. A explicação encontrada para isso é que, apesar do excesso de polímero (em carregamentos de 40 e 50% de PMOS inicial), a pressão exercida sobre esse excesso durante o enchimento, além de arrastar uma grande quantidade, vai fazer com que o polímero preencha por completo os poros e recubra a superfície da sílica, ficando fortemente sorvido. O

resultado será um material com maior quantidade de PMOS que nos enchimentos com 10 e 20% de PMOS inicial, promovendo uma maior área de fase reversa para interação com os solutos e conseqüente aumento na eficiência da coluna.

Caracterização das fases estacionárias

Alguns lotes de fases estacionárias foram submetidos à espectroscopia no infravermelho, análise elementar de carbono, área superficial específica e termogravimetria, tanto antes do enchimento das colunas como após o enchimento, a partir do material residual do enchimento, já com o PMOS arrastado.

Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho da sílica zirconizada com PMOS sorvido antes e após o enchimento das colunas (Figura 13) têm em comum tanto as bandas do suporte (estiramento (ν) de grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e à grupos hidroxilas geminais (3500cm^{-1}), grupos siloxanos (1100cm^{-1})) como bandas do polímero (tripleto, em 2900cm^{-1} , relativo ao estiramento (ν) dos grupos metila, duplete largo em 1100 e 1030cm^{-1} relativo ao estiramento (ν) dos grupos siloxanos e uma banda em torno de 800cm^{-1} relativa a deformação assimétrica (ρ) dos grupos metilas). As bandas relativas ao estiramento (ν) dos grupos siloxanos (1100cm^{-1}) da sílica zirconizada e ao duplete largo em 1100 e 1030cm^{-1} de estiramento (ν) dos grupos siloxanos do PMOS se confundem nos espectros das fases estacionárias.

Uma observação importante na figura 13b é a redução da intensidade das bandas do PMOS, em relação a figura 13a, por se tratar do material após o enchimento da coluna, ou seja, já com uma certa quantidade de PMOS arrastado durante processo.

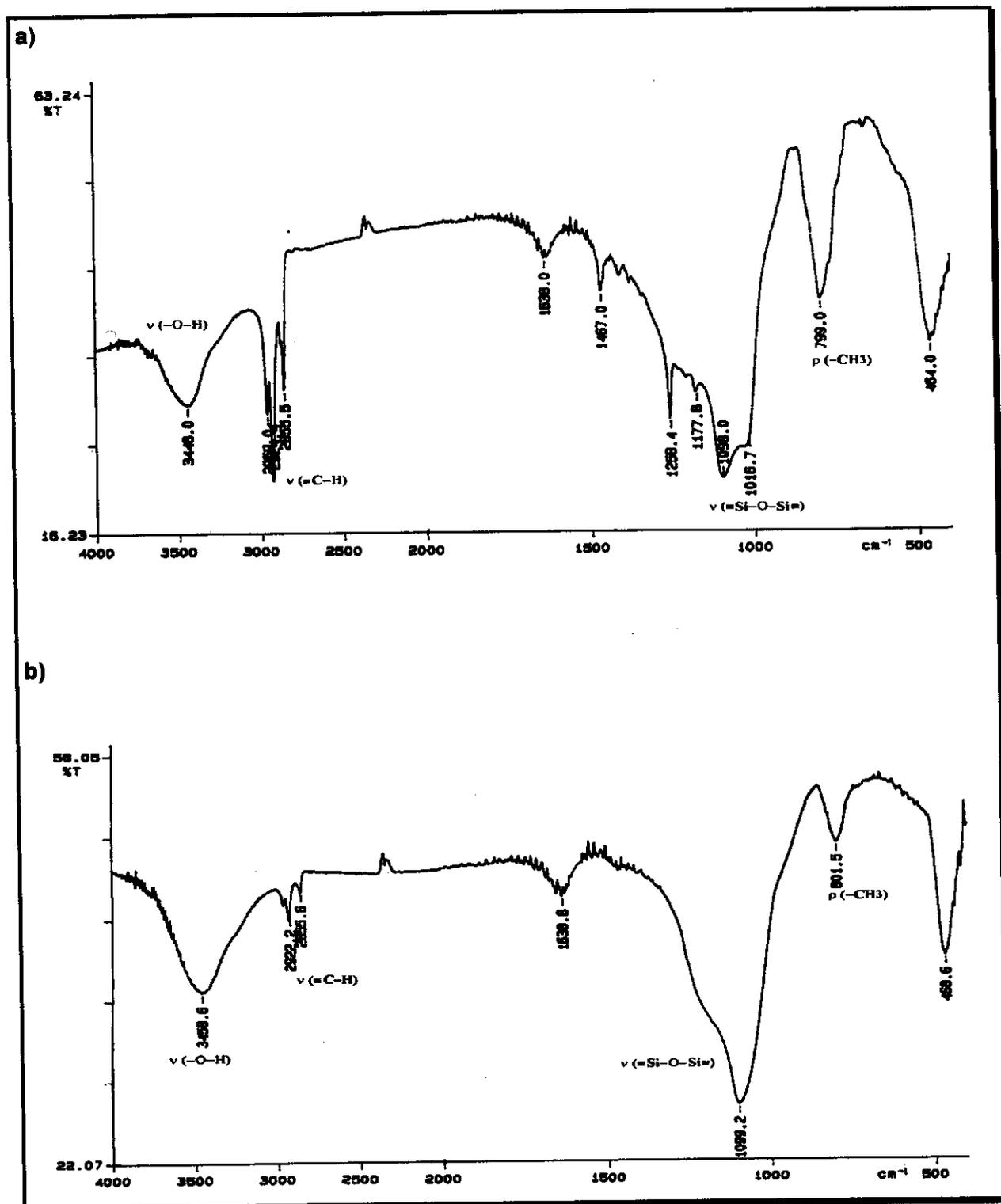


Figura 13: Espectros no infravermelho de sílica zirconizada recoberta com 50% de PMOS sorvido: (a) antes e (b) após o enchimento da coluna

Análise elementar de carbono

O arraste de PMOS durante o enchimento de colunas, que pode ser identificado qualitativamente nos espectros no infravermelho, pode ser quantificado através dos resultados de análise elementar de carbono (Tabela 9).

Tabela 9: Porcentagem de carbono e de PMOS em fases estacionárias com carregamento inicial de 50% PMOS

Etapa	% carbono (faixa de valores obtidos)	% PMOS (faixa de valores obtidos)
antes do enchimento	30 - 33	49 - 53
resíduo de enchimento (fases sorvidas)	8,1 - 15	13 - 24
resíduo de enchimento (fases irradiadas)	14 - 16	23 - 26

Os resultados apresentados, para o material de recheio carregado inicialmente com 50% de PMOS, mostra que, antes do enchimento das colunas, o valor de %PMOS, obtido a partir da % carbono, é concordante com a quantidade de PMOS definida previamente e adicionada. Após o enchimento das colunas, a análise do resíduo de enchimento, já com o PMOS arrastado, indica uma queda no carregamento polimérico de 50 a 70% do carregamento inicial para as fases sorvidas e de 48 a 50% para as irradiadas. Estes dados já indicam uma melhoria na estabilidade do material irradiado, que será discutida mais adiante.

Área superficial específica (A_{BET})

A perda de material polimérico, observada através dos dados de análise elementar de carbono, irá refletir diretamente sobre o valor de área superficial específica.

Os resultados da tabela 10 mostram que, após a adição da fase líquida, PMOS, a área superficial se reduz drasticamente, de $360\text{m}^2\text{g}^{-1}$ (em média), do suporte, para $0,37\text{m}^2\text{g}^{-1}$. Essa queda brusca é atribuída à formação de um filme que deve envolver toda a partícula, por causa do excesso de polímero adicionado. Pode acontecer também uma aglomeração de partículas promovida pelo excesso

de polímero, e esse fato faz com que esse resultado de medida de área superficial específica não seja completamente confiável. De qualquer forma, o excesso de polímero será arrastado durante o processo de enchimento da coluna e a área superficial que resultará após o arraste ($247\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) é onde efetivamente irá ocorrer o fenômeno cromatográfico.

Tabela 10: Área superficial específica de sílica zirconizada (lote III) + 50% PMOS em várias etapas

Etapa	$A_{\text{BET}} (\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1})$
antes do enchimento	0,37
resíduo de enchimento	247
após utilização da coluna	351

Observa-se ainda que, mesmo após a utilização da coluna, ainda há um aumento da área superficial, para $351\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, ocasionado pela perda polimérica, devido a instabilidade do material sorvido, que será discutida posteriormente.

Análise termogravimétrica (ATG)

O termograma da fase estacionária sorvida (sílica zirconizada + 50% PMOS) (Figura 14) apresenta uma perda maior de massa se comparado com o termograma da sílica zirconizada (Figura 10). Há uma perda de massa de 37,7% na faixa de temperatura que vai de 390 até 520°C, atribuída a perda de polímero pelo aquecimento. Como, em CLAE, geralmente não se trabalha em temperaturas tão elevadas, não se considera esta perda como um dado preocupante para o bom andamento das análises, mas apenas como um dado complementar para caracterização do material preparado. O termograma para a fase irradiada apresentou resultados muito semelhantes aos da fase sorvida.

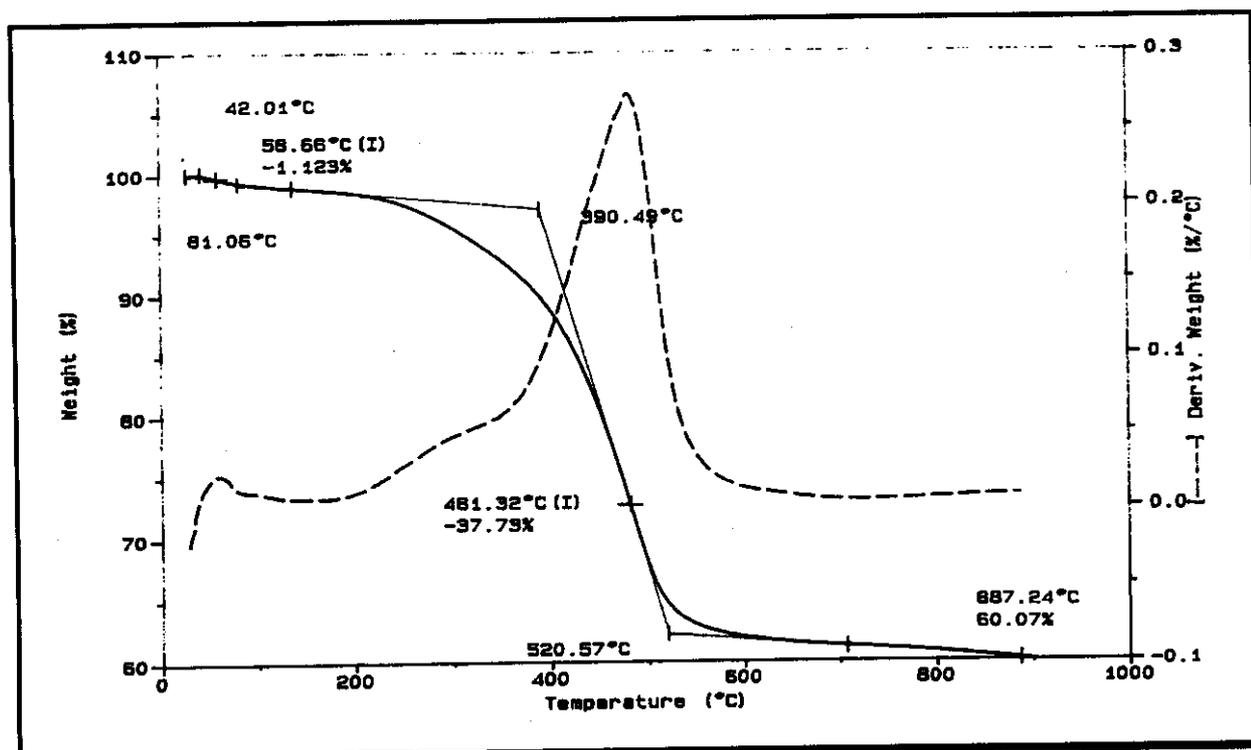


Figura 14: Termograma de sílica zirconizada recoberta com 50% de PMOS sorvido

Avaliação Cromatográfica

Definição da vazão de trabalho

A vazão de trabalho foi definida com base nas curvas de van Deemter, onde foram plotados os valores de altura de um prato (H) vs. velocidade linear da fase móvel (μ), extraídos dos cromatogramas obtidos em vazões de fase móvel que variaram de 0,05 a 0,7 mL·min⁻¹. Os resultados são apresentados na figura 15.

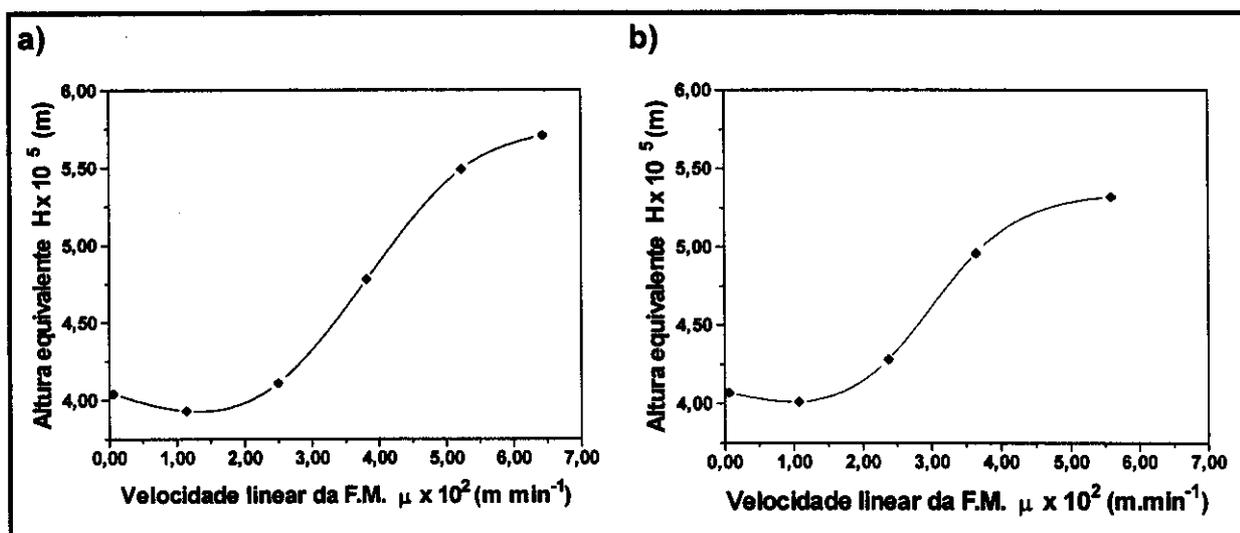


Figura 15: Curvas de van Deemter para as colunas de sílica zirconizada com 50% PMOS sorvido, recheadas a **a)** 48,3MPa (7000psi), **b)** 34,5MPa (5000psi); fase móvel: MeOH: H₂O (70:30) v/v

Existe uma vazão ótima na qual a coluna irá apresentar uma eficiência máxima, identificada pelo mínimo das curvas. Para as duas curvas aqui apresentadas (Figuras 15a e 15b) esta vazão é de 0,1mL.min⁻¹, resultando em eficiências de 25245 e 24944 pratos/metro, respectivamente. Apesar das curvas indicarem este valor como ótimo, o ganho em eficiência não é tão significativo quando comparado com a vazão de 0,2mL.min⁻¹ (24321 e 23364 pratos/metro), sendo que nesta vazão o tempo de análise reduz em aproximadamente 50%. Assim, definiu-se como vazão de trabalho 0,2mL.min⁻¹.

Otimização do carregamento de PMOS

O estudo realizado para otimização do carregamento de PMOS a ser sorvido no suporte zirconizado consistiu na preparação de dois lotes de fases estacionárias, com 40 e 50% (m/m), e enchimento de duas colunas com cada uma das fases preparadas.

A tabela 11 mostra os resultados obtidos. Os valores de cada linha da tabela correspondem à média das 3 primeiras injeções realizadas após o condicionamento das colunas.

Tabela 11: Otimização do carregamento de PMOS

COLUNA^a	t_R^b (min)	N/m^b (m⁻¹)	As^b	k^b	Rs^c	α^d	PMOS final (%)
40/10/34,5(5000)-A	12,86	20205	1,8	1,0	1,5	1,5	13
40/10/34,5(5000)-B	11,92	14578	2,0	0,9	1,3	1,5	15
50/10/34,5(5000)-A	14,45	30878	1,4	1,4	2,3	1,5	17
50/10/34,5(5000)-B	14,39	30612	1,5	1,3	2,3	1,5	17

^a a notação empregada para identificação das colunas indica %PMOS (m/m)/conc. de suspensão (m/v)/pressão de enchimento (MPa/psi)

^b calculado para o naftaleno

^c calculado para o par naftaleno-tolueno

^d calculado para o par tolueno-benzeno

Os resultados de %PMOS final apresentados na tabela 11 são baseados na pesagem do PMOS arrastado durante o enchimento da coluna, para os enchimentos realizados com fases estacionárias com carregamento de 40% de PMOS, e nos resultados de análise elementar de carbono do resíduo de enchimento das colunas, para os carregamentos de 50% de PMOS. Os dois métodos se mostraram equivalentes.

Observa-se um aumento da porcentagem de PMOS após o enchimento das colunas com fase estacionária inicialmente sorvidas com 50% de PMOS. Os valores maiores de fator de retenção obtidos para o carregamento inicial de 50% podem estar relacionados a esta maior quantidade de PMOS que fica retido, o que confere à fase estacionária características mais apolares.

Os parâmetros cromatográficos evidenciam que as colunas recheadas com as fases estacionárias cujo carregamento inicial é de 50% PMOS apresentam melhor desempenho cromatográfico, o que pode também ser evidenciado pelo perfil dos cromatogramas (Figuras 16a a 16d). Os melhores valores de eficiência (N/m), fator de assimetria (As) e resolução (Rs) para as colunas com 50%PMOS inicial fizeram com que esse valor fosse adotado como valor ótimo para a continuidade dos trabalhos.

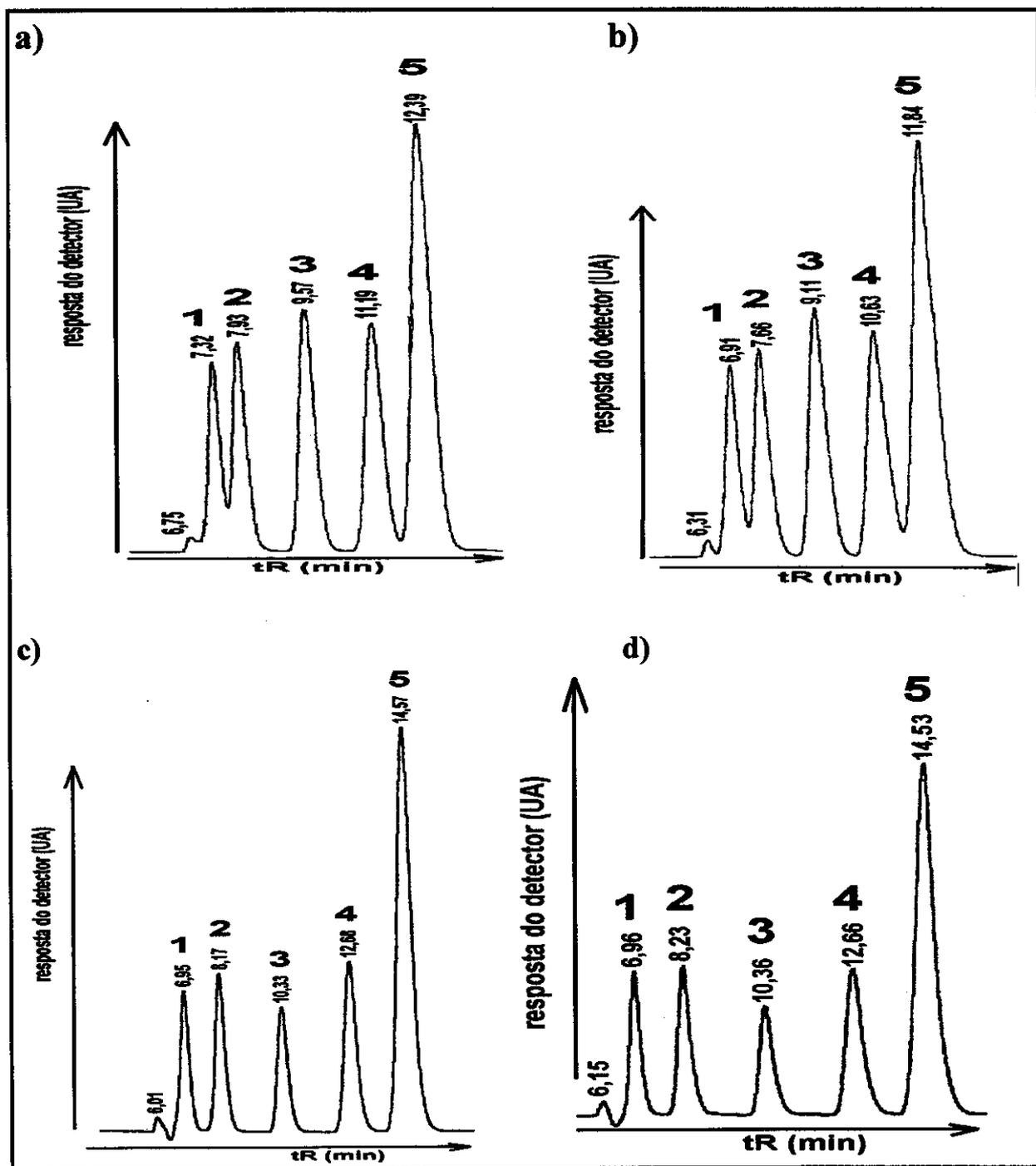


Figura 16: Cromatogramas obtidos no estudo para otimização do carregamento de PMOS. a) e b) colunas com 40% PMOS inicial e c) e d) colunas com 50% PMOS inicial. Condições: concentração da suspensão de enchimento: 10% (m/v); pressão de enchimento: 34,5 MPa (5000psi); solutos: acetona (1), benzonitrila (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5); F.M.: MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão: 0,2 mL·min⁻¹, volume de injeção: 10μL, detecção: UV, 254nm e velocidade do papel: 0,5cm·min⁻¹

Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento

Uma vez definido o carregamento de PMOS, este parâmetro foi fixado e variaram-se os parâmetros concentração de suspensão e pressão de enchimento, em dois níveis cada. Com cada uma destas combinações (Tabela 3) foram recheadas duas colunas. As colunas recheadas com concentração de suspensão de 10% (m/v) e pressão de enchimento de 34,5MPa (5000psi) foram as mesmas utilizadas no estudo de otimização de carregamento.

Os resultados obtidos estão na tabela 12.

Tabela 12: Otimização da concentração das suspensões e da pressão de enchimento

COLUNA^a	t_R^b (min)	N/m^b (m⁻¹)	As^b	k^b	Rs^c	α^d	PMOS final (%)
50/10/34,5(5000)-A	14,45	30878	1,4	1,4	2,3	1,5	17
50/10/34,5(5000)-B	14,39	30612	1,5	1,3	2,3	1,5	17
50/10/48,3(7000)-C	13,72	27817	1,6	1,0	1,9	1,5	17
50/10/48,3(7000)-D	18,62	30324	1,7	2,0	2,7	1,6	18
50/20/34,5(5000)-E	16,97	21725	2,8	1,6	2,1	1,6	14
50/20/34,5(5000)-F	18,66	17816	1,9	2,0	2,0	1,6	18
50/20/48,3(7000)-G	20,83	16043	2,6	2,3	2,0	1,6	18
50/20/48,3(7000)-H	16,89	16481	2,9	1,7	1,8	1,6	22

^a a notação empregada para identificação das colunas indica %PMOS (m/m)/conc. de suspensão (m/v)/pressão de enchimento (MPa/psi)

^b calculado para o naftaleno

^c calculado para o par naftaleno-tolueno

^d calculado para o par tolueno-benzeno

Com base nestes dados foram definidas a concentração de suspensão de 10% (m/v) e a pressão de enchimento de 34,5MPa (5000psi) como valores otimizados.

Pôde-se observar que as colunas cujas suspensões foram preparadas a 20% (colunas E-H) apresentaram uma queda significativa em eficiência (N/m) e um aumento do fator de assimetria (As) em relação às colunas onde foram utilizadas suspensões a 10%. As suspensões preparadas a 20% não permitem uma dispersão eficiente do material de recheio que, quando preparado com carregamento de 50% de PMOS apresenta-se na forma de aglomerados e não de um pó finamente

dividido, como é comum para fases estacionárias. Isso pode resultar num leito não homogêneo nas colunas cromatográficas.

Nesta otimização, a pressão de enchimento (dentro do intervalo escolhido) não se mostrou como um fator de extrema relevância no resultado cromatográfico, inclusive na quantidade final de PMOS após o enchimento. Observa-se uma ligeira queda em eficiência e um também ligeiro aumento no fator de assimetria, para colunas recheadas a 48,3MPa (7000psi). Em face destes resultados e devido ao fato de enchimentos com pressão mais elevada sempre estarem sujeitos a um risco maior de danificação no leito cromatográfico, optou-se pelo valor de 34,5MPa (5000psi), uma vez que, em não havendo diferenças significativas nos resultados, é melhor sempre trabalhar com menor pressão possível.

Os cromatogramas obtidos com as colunas A e B podem ser observados nas figuras 16c e 16d. Os cromatogramas relativos às colunas C-H são mostrados nas figuras 17a a 17f.

Irradiação de fases estacionárias

O principal problema enfrentado no desenvolvimento das fases estacionárias reversas à base de sílica zirconizada é quanto à estabilidade do polímero no suporte à medida que se utiliza a coluna. Observa-se que, a cada injeção, acontece uma redução nos valores de eficiência e de fator de retenção (Tabela 13), o que sugere um arraste da fase líquida sorvida enquanto a coluna está em uso.

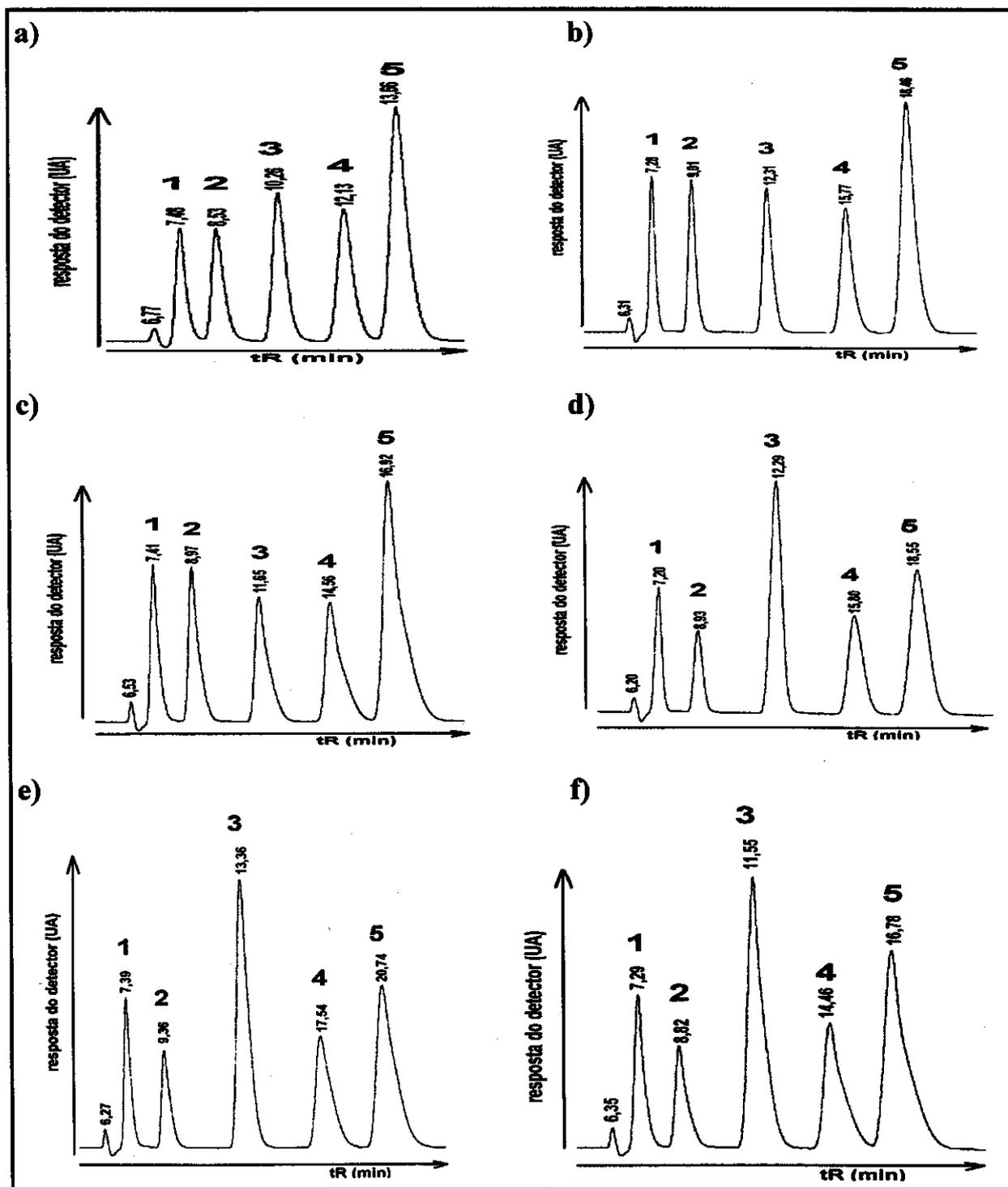


Figura 17: Cromatogramas obtidos na otimização da concentração das suspensões e pressão de enchimento. **a)** e **b)** colunas preparadas com suspensão a 10% (m/v) e pressão de enchimento de 48,3MPa (7000psi); **c)** e **d)** 20% e 34,5MPa (5000psi); **e)** e **f)** 20% e 48,3MPa (7000psi). Condições: carregamento inicial de PMOS: 50%; solutos: acetona (1), benzonitrila (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5); F.M.: MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão: 0,2mL.min⁻¹, volume de injeção: 10μL, detecção: UV, 254nm e velocidade do papel: 0,5cm.min⁻¹

Tabela 13: Variação de parâmetros cromatográficos em relação ao número de injeções

COLUNA ^a	t _R ^b (min)	N/m ^b (m ⁻¹)	As ^b	k ^b	Rs ^c	α ^d
50/10/34,5(5000)-A	14,57	31411	1,2	1,4	2,3	1,5
	14,43	30794	1,5	1,4	2,3	1,5
	14,34	30428	1,5	1,4	2,2	1,5
	13,81	28205	1,7	1,1	2,1	1,6
	13,70	27757	1,4	1,1	2,0	1,6
	13,52	27057	1,3	1,1	1,9	1,6
	13,52	27053	1,6	1,0	1,9	1,6
	12,86	27096	1,4	0,9	1,6	1,6
50/10/34,5(5000)-B	14,53	31226	1,4	1,4	2,3	1,5
	14,36	30504	1,5	1,3	2,3	1,5
	14,26	30106	1,5	1,3	2,2	1,5
	13,76	28005	1,6	1,1	1,9	1,6
	13,72	27834	1,6	1,1	1,9	1,6
	13,58	27285	1,9	1,1	1,8	1,6
	13,57	27241	1,6	1,0	1,8	1,6
	13,00	24997	1,9	0,9	1,5	1,6

^a a notação empregada para identificação das colunas indica %PMOS (m/m)/conc. de suspensão (m/v)/pressão de enchimento (MPa/psi)
suporte: sílica zirconizada

^b calculado para o naftaleno

^c calculado para o par naftaleno-tolueno

^d calculado para o par tolueno-benzeno

Obs: cada linha corresponde a uma injeção

Existe um problema quanto à interação do polímero com o suporte. Nas fases à base de sílica não modificada, a sorção do polímero ocorre através dos grupos silanóis. A modificação da sílica com zircônio ocorre exatamente nos grupos silanóis e, aparentemente, essa diminuição dos silanóis disponíveis reduz a capacidade do suporte em sorver o polímero. Os grupos ≡Zr-OH não são pontos de ligação com o polímero tão eficientes quanto os grupos silanóis.

Uma possível solução para esse problema é a irradiação das fases com raios gama. Além de promover um entrecruzamento entre as cadeias, a irradiação pode promover também a ligação do polímero com o suporte.

A irradiação de fases estacionárias foi realizada para um mesmo lote de material, preparado segundo o procedimento descrito na parte *Experimental*. Duas porções do material foram irradiadas sob condições ambientes, uma a 80 e a outra a 120kGy. Com cada uma dessas fases irradiadas foram enchidas duas colunas.

Para fins comparativos, duas outras colunas foram recheadas com o mesmo lote de fase estacionária, porém sem ser submetido ao processo de irradiação.

Os resultados são mostrados na tabela 14.

Tabela 14: Valores dos parâmetros cromatográficos e porcentagem final de PMOS para colunas de sílica zirconizada recheadas com fases estacionárias sorvida e irradiada

COLUNA ^a	t _R ^b (min)	N/m ^b (m ⁻¹)	As ^b	k ^b	Rs ^c	α ^d	PMOS final (%)
I (fase sorvida)	14,33	21075	1,7	1,3	1,7	1,6	14
II (fase sorvida)	14,37	25240	2,2	1,3	1,8	1,6	18
III (irradiada 80kGy)	24,88	31664	0,9	3,5	3,0	1,7	25
IV (irradiada 80kGy)	23,93	41711	1,0	3,5	3,4	1,7	23
V (irradiada 120kGy)	27,12	22471	1,0	4,5	2,6	1,7	26
VI (irradiada 120kGy)	27,41	25192	1,1	4,4	2,8	1,7	26

^a condições de enchimento: PMOS inicial: 50%; conc. de suspensão: 10%; pressão de enchimento: 34,5MPa (5000psi)

^b calculado para o naftaleno

^c calculado para o par naftaleno-tolueno

^d calculado para o par tolueno-benzeno

As colunas recheadas com fases estacionárias irradiadas mostraram um comportamento cromatográfico bem melhor que as colunas com fase sorvida.

O primeiro efeito da irradiação que se pode observar é sobre a porcentagem de PMOS presente na fase logo após o enchimento (aumento de 14 e 18% nas sorvidas para 25% (em média) nas irradiadas). Este resultado reflete diretamente nos valores de retenção (tanto em t_R quanto em k); a maior quantidade de fase líquida presente irá promover uma maior retenção dos compostos apolares na fase estacionária. Pode-se observar através dos valores de t_R e de k (Tabela 14) que este aumento foi proporcional à dose de irradiação.

Verifica-se também um aumento nos valores de eficiência para as colunas irradiadas, sendo mais pronunciado para a dose de 80kGy.

A simetria e a resolução entre os picos também são bem melhores para as colunas irradiadas. Isto pode ser visualizado claramente através dos

cromatogramas (Figuras 18a a 18c). É importante observar que os picos cromatográficos, em CLAE, tendem a apresentar um aumento do fator de assimetria à medida que se aumenta a retenção do composto. Nas colunas irradiadas, apesar do aumento de retenção, os valores de fator de assimetria ficaram em torno de 1,0, o que indica picos perfeitamente simétricos, ou seja, o que sempre se busca quando se trabalha com cromatografia.

A quantidade semelhante de PMOS nas colunas de 80 e 120kGy, a princípio sugerem um comportamento cromatográfico também semelhante. Os resultados piores das colunas irradiadas a 120kGy em relação às de 80kGy, em termos de eficiência, podem ser atribuídos ao maior alargamento de banda daquelas colunas. Problemas de alargamento de banda podem ser causados pela própria compactação do leito cromatográfico (que sempre varia de enchimento para enchimento) ou por um entrecruzamento excessivo nas cadeias poliméricas, causado pela alta dose de radiação, o que irá diminuir a velocidade de transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, resultando em perda de eficiência.

Os dados apresentados sugerem que a irradiação promoveu um fortalecimento da estrutura polimérica, através do entrecruzamento das cadeias, gerando uma fase estacionária líquida com maior capacidade de retenção dos compostos. Aparentemente ocorreu também uma maior blindagem dos grupos silanóis residuais e até mesmo dos grupos $\equiv\text{Zr-OH}$, que contribuem para a melhora da simetria dos picos.

Teste de estabilidade em fase móvel neutra

A estabilidade das colunas foi testada passando-se quantidades de fase móvel expressas em volumes de coluna (Eq. 11), com injeção da amostra I em triplicata e em intervalos de tempo pré-determinados. Foram avaliadas colunas com fases estacionárias reversas à base de sílica não modificada, sílica zirconizada sorvida e sílica zirconizada irradiada a 80kGy. O teste foi realizado chegando-se até 5000 volumes de coluna.

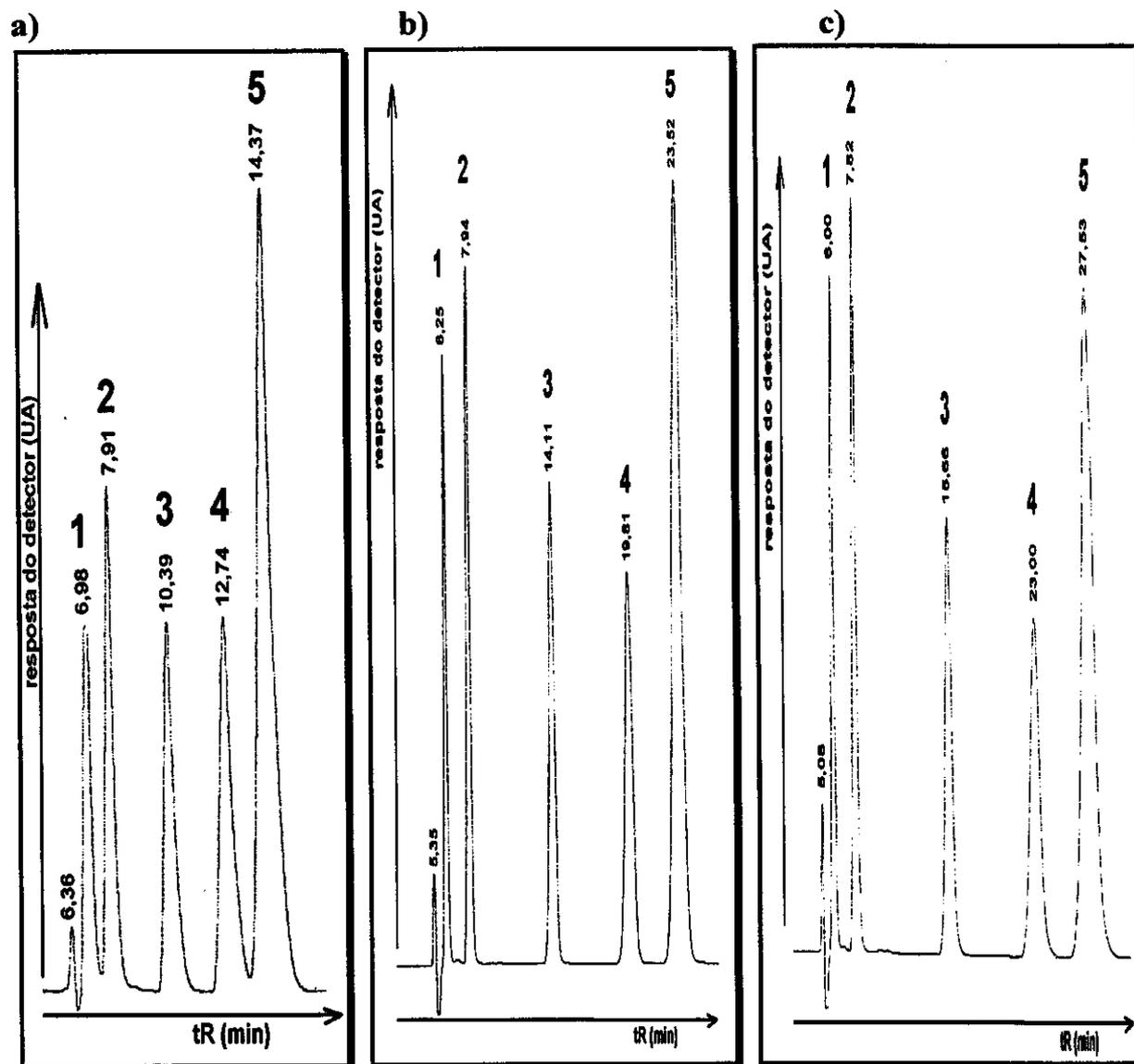


Figura 18: Cromatogramas obtidos no estudo do efeito da irradiação das fases estacionárias: **a)** coluna de sílica zirconizada sorvida (II), **b)** irradiada a 80kGy (IV) e **c)** 120kGy (VI). Condições: carregamento inicial de PMOS: 50%; concentração de suspensão: 10%; pressão de enchimento: 34,5MPa (5000psi); solutos: acetona (1), benzonitrila (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5); F.M.: MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão: 0,2mL·min⁻¹, volume de injeção: 10μL, detecção: UV, 254nm e velocidade do papel: 0,5cm·min⁻¹

Os resultados estão dispostos na forma de gráficos (Figuras 19 a 21) de eficiência (N/m), fator de retenção (k) e resolução (R_s) *versus* volumes de coluna. Os valores de fator de assimetria (A_s) e fator separação (α) não apresentaram grandes variações e por isso não são apresentados aqui.

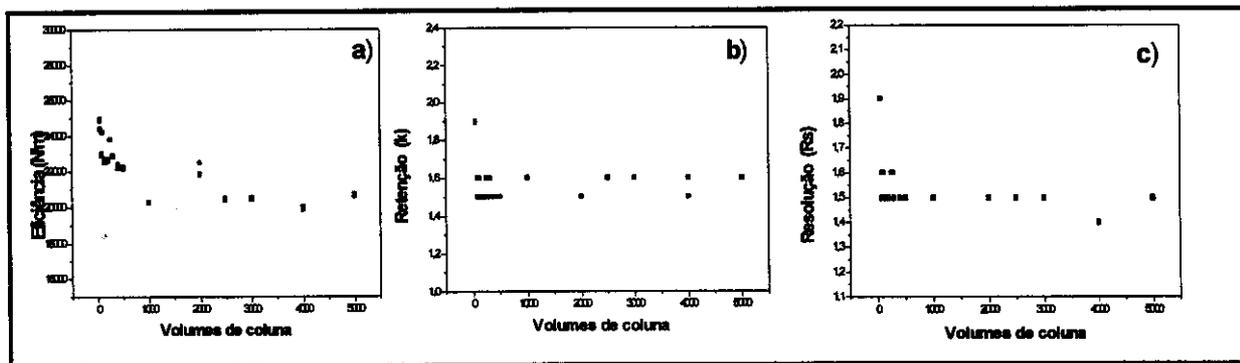


Figura 19: Teste de estabilidade da coluna de sílica não modificada com PMOS sorvido. a) eficiência (N/m); b) fator de retenção (k); c) resolução (R_s)

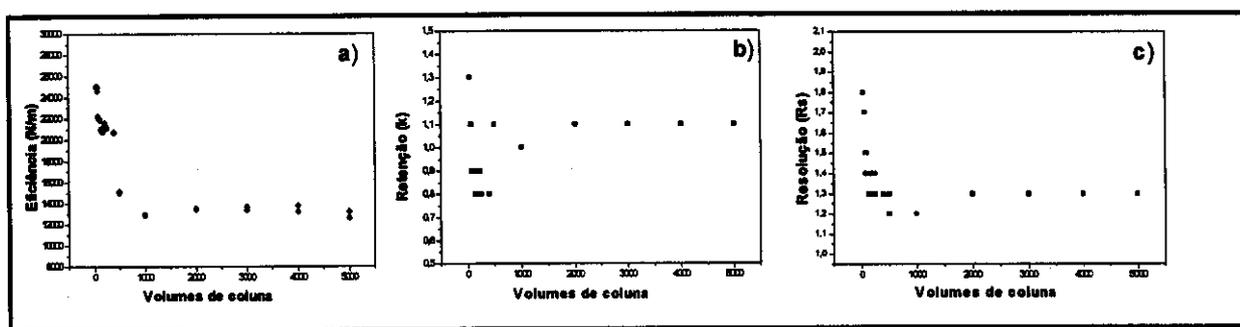


Figura 20: Teste de estabilidade da coluna de sílica zirconizada com PMOS sorvido. a) eficiência (N/m); b) fator de retenção (k); c) resolução (R_s)

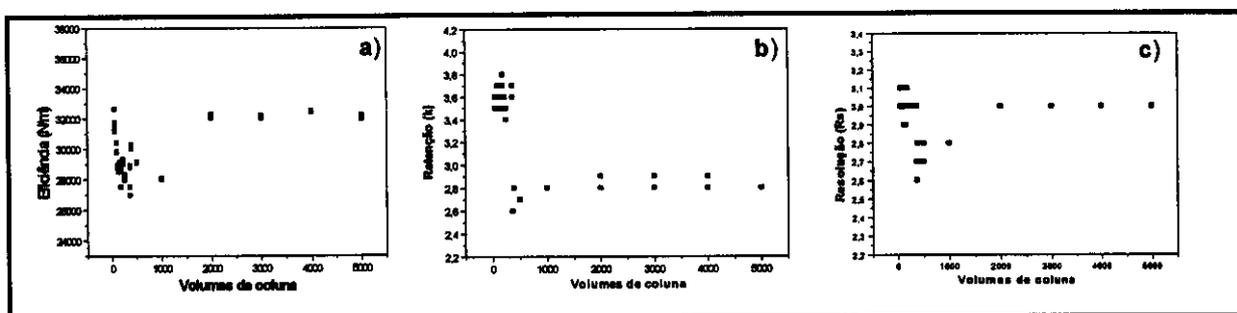


Figura 21: Teste de estabilidade da coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado. a) eficiência (N/m); b) fator de retenção (k); c) resolução (R_s)

A coluna à base de sílica não modificada (Figuras 19 a-c) mostrou-se estável, com os valores de eficiência variando entre 25000 e 20000 pratos/metro. Os valores de fator de retenção e resolução também tiveram uma pequena queda inicial e, após isto, se mantiveram estáveis.

A coluna de sílica zirconizada com PMOS sorvido apresentou uma queda acentuada nos valores de eficiência (Figura 20a) durante as primeiras injeções (até 500 volumes de coluna), quando então se observa uma estabilização do valor de eficiência, porém em um patamar baixo (12000 pratos/metro) se comparado com os valores iniciais (25000 pratos/metro). Este resultado, juntamente com a queda em resolução (Figura 20c), indicam uma possível perda de PMOS e um rearranjo do leito cromatográfico, que afetou irreversivelmente a qualidade da coluna. O fator de retenção (Figura 20b), apesar de ter melhorado após 1000 volumes de coluna, ainda esteve em torno de 1,1, valor abaixo do aceitável (acima de 2,0¹¹).

Na coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado (Figura 21a) observou-se também uma queda inicial de eficiência, seguida de uma estabilização, porém no patamar de 32000 pratos/metro, que é o mesmo do início do teste. Considerando que, por volta de 500 a 1000 volumes de coluna, o valor de eficiência esteve em 27000 pratos/metro, esse comportamento pode ser atribuído a uma perda de PMOS no início do teste, com posterior retomada dos valores de eficiência, provavelmente devido à rearranjos no leito cromatográfico. Isso foi possível porque a quantidade final de PMOS foi suficiente para manter a performance inicial da coluna. Esse resultado é confirmado pelo gráfico de resolução (Figura 21c), que tem o mesmo perfil que o gráfico de eficiência. Por sua vez, o fator de retenção (Figura 21b) apresenta uma queda, não restabelecendo os valores originais, como aconteceu com a eficiência e a resolução, uma comprovação de perda de polímero, uma vez que a retenção está diretamente relacionada com esse parâmetro.

Teste de estabilidade em fase móvel alcalina

Para o estudo da estabilidade das fases estacionárias em fase móvel alcalina, foram avaliadas colunas à base de sílica não modificada com PMOS sorvido e de sílica zirconizada com PMOS irradiado a 80kGy. Estas colunas foram as

mesmas utilizadas no teste de estabilidade com fase móvel neutra. Como no teste anterior, o estudo foi feito até 5000 volumes de coluna.

Os resultados estão dispostos na forma de gráficos (Figuras 22 a 23) de eficiência (N/m), fator de retenção (k) e resolução (R_s) *versus* volumes de coluna. Os valores de fator de assimetria (A_s) e fator separação (α) também não apresentaram grandes variações e por isso não são apresentados.

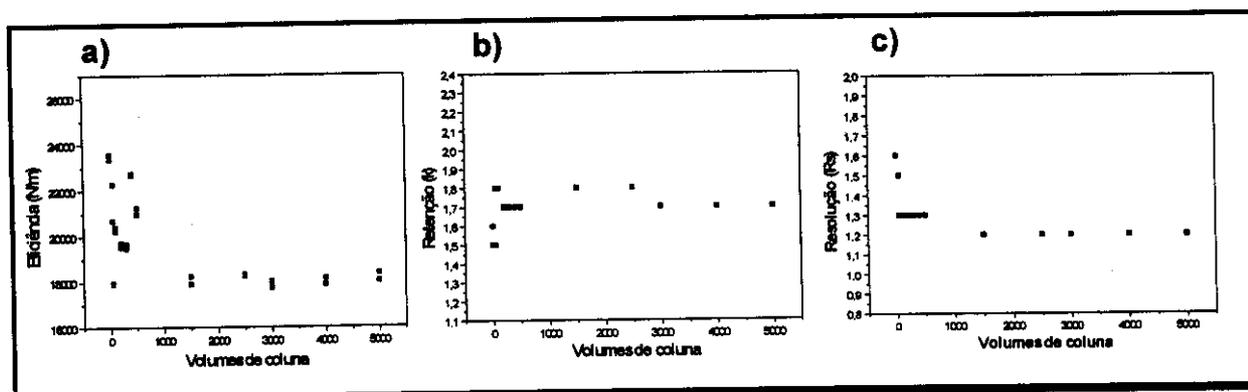


Figura 22: Teste de estabilidade com fase móvel alcalina da coluna de sílica não modificada com PMOS sorvido. **a)** eficiência (N/m); **b)** fator de retenção (k); **c)** resolução (R_s)

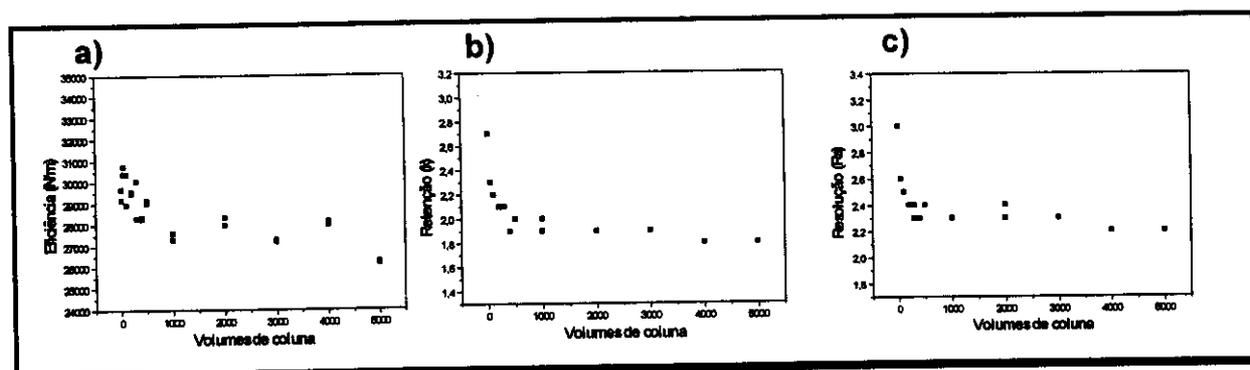


Figura 23: Teste de estabilidade com fase móvel alcalina da coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado. **a)** eficiência (N/m); **b)** fator de retenção (k); **c)** resolução (R_s)

A coluna à base de sílica não modificada apresentou uma queda em eficiência de 6000 pratos/metro nos primeiros 500 volumes de coluna, estabilizando em 18000 pratos/metro (Figura 22a). Pode se dizer que é uma estabilidade muito

boa vista que no teste com fase móvel neutra (uma fase móvel bem menos agressiva) a queda em eficiência no início foi muito semelhante (5000 pratos/metro), estabilizando em 20000 pratos/metro. Além disso, a coluna já havia sido testada com fase móvel neutra até 5000 volumes de coluna. A retenção manteve-se praticamente estável (Figura 22b) e a resolução mostrou um comportamento semelhante à eficiência, com uma queda no início, estabilizando-se em seguida (Figura 22c).

A coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentou uma queda de 2500 pratos/metro nos primeiros 500 volumes de coluna (Figura 23a), passando a oscilar entre 28000 e 26000 pratos/metro, até os 5000 volumes de coluna. Os parâmetros de retenção e de resolução mostraram também uma queda nos primeiros 500 volumes de coluna, estabilizando-se em seguida.

Ambas as colunas mostraram um comportamento semelhante com relação a eficiência e resolução, porém, ao final do teste, os parâmetros da coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado foram bem mais interessantes, como mostra a tabela 15.

Tabela 15: Comparação dos resultados cromatográficos antes e após os testes de estabilidade

COLUNA ^a	N/m ^b			k ^b		Rs ^c	
	antes	após	queda(%)	antes	após	antes	após
sílica não modificada	24565	18118	28	1,9	1,8	1,7	1,2
sílica zirconizada irradiada 80kGy	32621	26168	19	3,6	1,8	3,1	2,3

^a condições de enchimento: PMOS inicial: 50%; conc. de suspensão: 10%; pressão de enchimento: 34,5MPa (5000psi)

^b calculado para o naftaleno

^c calculado para o par naftaleno-tolueno

A partir dos dados da tabela 15 pode-se afirmar que a retenção do último pico foi semelhante em ambas as colunas (1,8), o que implica num tempo de análise muito próximo (17 minutos) para ambas as colunas. A coluna recheada com sílica zirconizada e submetida a um processo de imobilização da fase líquida através de radiação gama é um material mais estável a fase móvel alcalina que a coluna recheada com sílica. Ao longo de todo o estudo de estabilidade (passagem de 5000 volumes de coluna de fase móvel neutra e 5000 volumes de

coluna de fase móvel alcalina) a eficiência da coluna de sílica não modificada passou de 24565 pratos/metro iniciais para 18118 pratos/metro (queda de 28% na eficiência). Para a coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado esta queda foi de 32621 para 26168 pratos/metro (19%).

Talvez mais importante que isso, seja o fato de que a coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentou valores de fator de assimetria para o último pico que se mantiveram sempre em torno de 1,0 e resolução para o último par de picos (tolueno-naftaleno) sempre por volta de 3,0, caindo apenas ao final do teste com fase móvel alcalina para 2,3, o que ainda é um bom valor. Para a coluna de sílica não modificada, o fator de assimetria ficou sempre por volta de 1,8 e a resolução nunca foi maior que 1,7.

Portanto, neste estudo observou-se que a coluna recheada com sílica zirconizada com PMOS irradiado a 80kGy, apresentou-se como um material de bom comportamento cromatográfico, sob o ponto de vista de eficiência, resolução e simetria dos picos e de tempo de análise e estável quimicamente a fases móveis neutra e alcalina, nas condições de análise.

Teste com Mistura Básica

As condições cromatográficas para eluição da mistura básica foram alteradas para composição de fase móvel MeOH:H₂O 60:40 (v/v) e vazão 0,5mL·min⁻¹. Estas condições foram as que permitiram que se obtivessem separações onde fosse possível a análise comparativa dos resultados entre as colunas recheadas com sílica não modificada com PMOS sorvido, sílica zirconizada com PMOS sorvido e sílica zirconizada com PMOS irradiado a 80 kGy.

Os dados da tabela 16 mostram que a coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentou melhores resultados que a de sílica zirconizada com PMOS sorvido e também que a coluna de sílica não modificada.

A ordem de eluição dos dois compostos básicos analisados pode ser discutida em termos de basicidade e de polaridade. A anilina apresenta uma basicidade ($K_b=4,2 \cdot 10^{-10}$) ligeiramente inferior à da N,N-dimetilanilina ($K_b=11,7 \cdot 10^{-10}$) e elui primeiro por ser menos influenciada pelos grupos silanóis livres disponíveis. Entretanto, seu tempo de retenção é cerca da metade da N,N-dimetilanilina e isto

Tabela 16: Parâmetros cromatográficos obtidos com os diversos tipos de fases estacionárias preparadas na análise da mistura básica

COLUNA ^a	t _R ^b (min)	t _R ^c (min)	N/m ^b (m ⁻¹)	N/m ^c (m ⁻¹)	As ^b	As ^c	k ^b	k ^c	Rs ^d	α ^d
VII (sílica não modificada)	3,37	7,16	16368	16394	2,0	1,7	0,3	1,8	8,9	5,9
II (sílica zirconizada sorvida)	3,38	6,18	13037	12214	2,6	2,8	0,3	1,3	6,3	4,7
III (sílica zirconizada irradiada 80kGy)	3,98	10,88	14603	17488	1,4	1,4	0,7	3,6	11,6	5,2

^a condições de enchimento: PMOS inicial: 50%; conc. de suspensão: 10%; pressão de enchimento: 34,5MPa (5000psi)

^b calculado para a anilina

^c calculado para a N,N-dimetilanilina

^d calculado para o par N,N-dimetilanilina/anilina

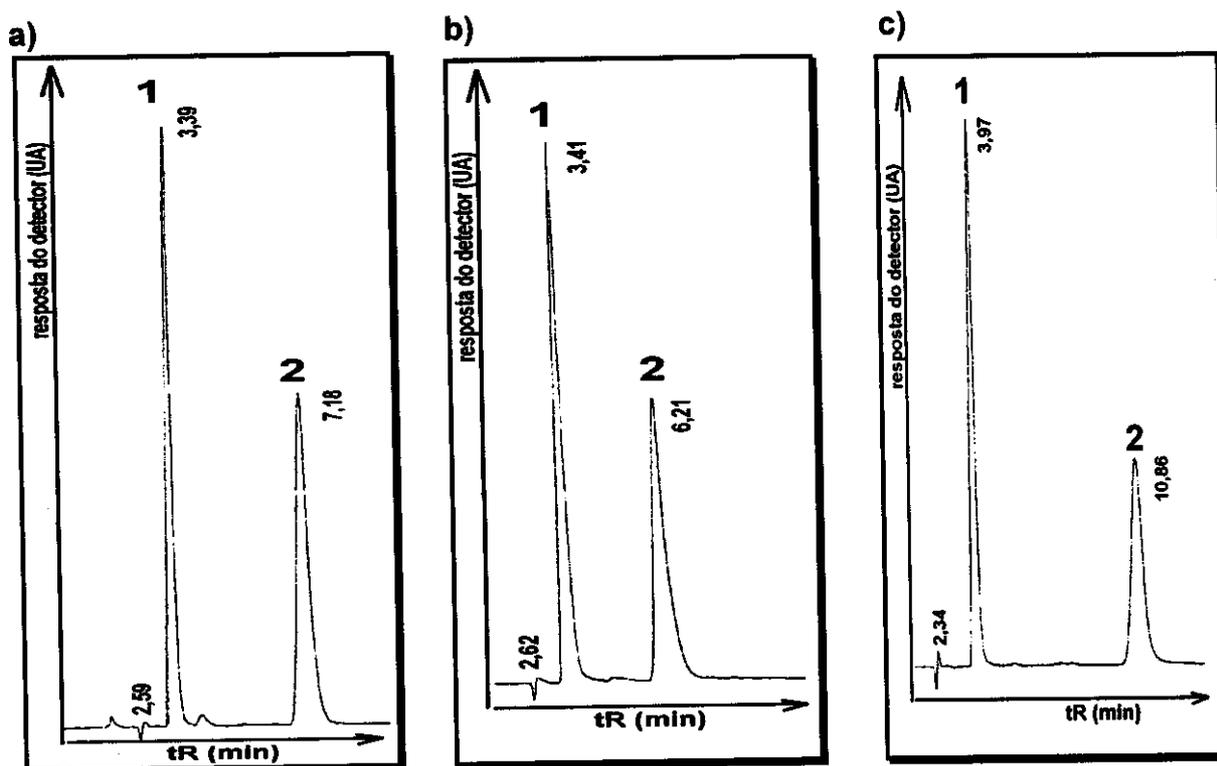


Figura 24: Cromatogramas obtidos na análise da mistura básica: coluna de **a)** sílica não modificada, **b)** sílica zirconizada sorvida **c)** sílica zirconizada irradiada a 80kGy. Condições: carregamento inicial de PMOS: 50%; concentração de suspensão: 10% (m/v); pressão de enchimento: 34,5MPa (5000psi); solutos: **anilina (1)**, **N,N-dimetilanilina (2)**; F.M.: MeOH:H₂O 60:40 (v/v); vazão: 0,5 mL·min⁻¹, volume de injeção: 10μL, detecção: UV, 254nm e velocidade do papel: 0,5cm·min⁻¹

ocorre também pois, em cromatografia líquida de fase reversa, a principal variável na realização efetiva das separações é a diferença de polaridade entre os solutos eluídos. Acredita-se que na fase irradiada há o entrecruzamento das cadeias poliméricas e isto aumenta o carregamento final de PMOS (de 16% para a coluna de sílica não modificada para 24% para a coluna de sílica zirconizada irradiada a 80kGy). A N,N-dimetilanilina possui 2 grupos metilas, o que diminui sua polaridade em relação a anilina e favorece sua interação com a fase reversa. A menor variação de t_r para anilina entre sílica não modificada e sílica zirconizada irradiada (0,6 minutos), em relação a N,N-dimetilanilina (3,7 minutos) pode ser atribuída à maior polaridade da anilina, que não será afetada tão fortemente pelo aumento do carregamento de PMOS, uma vez que ela mostra maior afinidade pela fase móvel que a N,N-dimetilanilina.

O desempenho cromatográfico mostrou-se melhor na coluna de sílica não modificada em relação à de sílica zirconizada com PMOS sorvido. A eficiência é maior, o fator de assimetria (apesar de alto) é menor e a resolução e o fator separação também são melhores. Estas deficiências podem ter como causa a baixa estabilidade do recobrimento polimérico sorvido no suporte de sílica zirconizada.

Na coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado observa-se um aumento na retenção dos compostos, devido ao aumento no carregamento de PMOS dessa coluna após o enchimento (Tabela 14). Os valores de eficiência e fator de separação são bastante semelhantes aos da coluna de sílica não modificada.

A resolução e, principalmente, o fator de assimetria são melhores na coluna irradiada. A superfície ácida da sílica possui uma tendência maior de reter compostos básicos, podendo até adsorvê-los irreversivelmente⁸. A sílica zirconizada possui uma superfície parcialmente modificada, o que lhe confere um caráter anfótero, reduzindo a possibilidade de retenção irreversível. Este comportamento pode ser evidenciado pelos dados de fator de assimetria mostrados na tabela 16, onde há uma melhora significativa nos valores para a coluna irradiada em relação à de sílica não modificada. É interessante observar que a N,N-dimetilanilina, bem

mais retida, mostrou assimetria igual à anilina. Sabe-se que quanto maior a retenção, maior a cauda do pico. Este resultado pode ser atribuído a uma conjugação tanto do efeito da modificação do suporte, tornando-a uma superfície de caráter anfótero, como também da maior blindagem dos grupos silanóis residuais pelo entrecruzamento do polímero, promovida pela irradiação.

Isto mostra que a zirconização do suporte, associada ao procedimento de imobilização pode ser uma boa alternativa para a análise de compostos básicos.

CONCLUSÕES

*“Vivendo se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas.”
(João Guimarães Rosa)*

Os resultados obtidos permitem afirmar que a modificação da superfície da sílica com zircônio e posterior recobrimento com poli(metiloctilsiloxano) e imobilização com radiação gama produz fases estacionárias para uso em CLAE de qualidade tão boa e, em alguns casos, até melhor que as fases estacionárias baseadas em sílica não modificada.

As primeiras etapas deste trabalho definiram a fase móvel ideal como sendo a mistura MeOH:H₂O, na proporção 70:30 (v/v), para análise de compostos neutros com polaridade variada, e a vazão de trabalho em 0,2mL.min⁻¹. O carregamento polimérico foi definido como sendo de 50% de PMOS (m/m), após um estudo de otimização que fixou as demais variáveis do processo de preparação de fases estacionárias, enchimento e condicionamento de colunas e condições cromatográficas.

A concentração das suspensões de fases estacionárias para enchimento de colunas foi fixada em 10% (m/v) e a pressão de enchimento em 34,5MPa (5000psi). Esta otimização envolveu uma série de quatro combinações de valores destes parâmetros, sendo utilizadas colunas em duplicata para cada combinação. Observou-se uma significativa piora no comportamento cromatográfico (principalmente em eficiência e no fator de assimetria) quando se utilizou concentração das suspensões de 20%.

O principal problema enfrentado foi a baixa estabilidade do recobrimento polimérico sobre o suporte de sílica zirconizada. A solução para este problema foi encontrada na imobilização do polímero sobre a sílica zirconizada, com radiação gama. As fases estacionárias baseadas em sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentaram-se como um bom material para uso cromatográfico na análise de compostos neutros com polaridade variável. Os cromatogramas obtidos com colunas recheadas com esse material (em especial o irradiado a 80kGy) apresentaram picos perfeitamente simétricos, excelente resolução entre os picos e eficiência de até 40000 pratos/metro, o que supera muito o esperado para colunas de partículas irregulares de 10µm de tamanho.

Testes de estabilidade realizados com colunas à base de sílica não modificada com PMOS sorvido, sílica zirconizada com PMOS sorvido e sílica zirconizada com PMOS irradiado, passando-se fase móvel neutra pela coluna até

5000 volumes de coluna, mostraram que as colunas com suporte à base de sílica não modificada são mais estáveis à passagem intensa de fase móvel, havendo uma ligeira variação dos parâmetros cromatográficos (Figura 19). A coluna de sílica zirconizada com PMOS sorvido apresentou uma acentuada queda nos valores de eficiência (Figura 20a), o que sugere um arraste de polímero durante a lavagem da coluna. A coluna de sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentou pouca variação na eficiência, ao longo do teste (Figura 21a). Isto pode ser um indicativo de maior estabilidade das fases irradiadas.

O mesmo teste de estabilidade, realizado com fase móvel alcalina, mostrou que as colunas à base de sílica zirconizada irradiada são mais resistentes à passagem de fase móvel de pH 10 que as colunas recheadas com fase estacionária a base de sílica não modificada. A queda em eficiência da coluna de sílica zirconizada irradiada foi de 19% enquanto que das colunas à base de sílica foi de 28%. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por *Chicz et al*²⁸.

Teste com mistura básica composta por anilina e N,N-dimetilanilina mostraram que as colunas de sílica zirconizada com PMOS irradiado apresentaram picos mais simétricos que as colunas de sílica não modificada. Isso comprova que a sílica zirconizada apresenta uma tendência menor que a sílica em interagir negativamente com compostos básicos, devido à sua natureza anfótera e à blindagem dos grupos silanóis residuais.

Pode-se concluir, de uma forma mais abrangente, que as fases estacionárias baseadas em sílica zirconizada podem apresentar um comportamento cromatográfico tão bom quanto as fases estacionárias baseadas em sílica, ou até melhor, como no teste de estabilidade com fase móvel alcalina e na análise de compostos básicos. Porém, a estabilização, com irradiação, deste material é vital para que se consigam bons resultados.

Direcionamentos Futuros

Como foi dito na exposição dos objetivos deste trabalho, ele tem aspectos de continuidade e de inovação. O aspecto inovador engloba as fases de síntese, caracterização e desenvolvimento cromatográfico de fases estacionárias baseadas em sílica zirconizada.

Acreditamos que, neste trabalho, contribuímos para o estabelecimento de um procedimento reprodutível para a síntese de sílica zirconizada e de parâmetros de preparação de fases estacionárias, que permitirão o recheio de colunas com alta performance cromatográfica.

Realizamos alguns testes físicos e químicos para caracterização dos materiais desenvolvidos e para elucidação de dúvidas que eram fundamentais para a continuidade do trabalho. Realizamos ainda testes de estabilidade no material preparado e uma aplicação deste material na separação de compostos de caráter básico.

Acreditamos que a continuidade desta linha de pesquisa caminha no sentido de basicamente dois pontos:

i) esclarecimento preciso da morfologia, estrutura de poros, forma como se distribui o zircônio e o polímero na superfície das partículas e no interior dos poros para que, com base nestes estudos, se possa ter dados sólidos para melhorar as características do suporte e do material de recheio das colunas.

ii) estudar potenciais aplicações para as colunas preparadas, de forma a suprir necessidades que as colunas a base de sílica não o fazem.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- 1 - Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S., coordenadores, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da UNICAMP, Campinas, 1990.
- 2 - Poole, C.F.; Schuette, S.A., "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1984.
- 3 - Major, R.E., "Chromatography Columns", *LC-GC*, **10**(1992)229.
- 4 - Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", *J. Chromatogr.*, **549**(1991)1.
- 5 - Unger, K.K., "Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", 3ª edição, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1986.
- 6 - Nahum, A. e Horváth, C., "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I - Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **203**(1981)53.
- 7 - Melander, W.; Stoveken, J. e Horváth, C., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography I - Comparison of Energetics of Retention on Alkyl-Silica Bonded Phases", *J. Chromatogr.*, **199**(1980)35.
- 8 - By, K.E.; Horváth, C.; Melander, W.R. e Nahum, A., "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phase II - Irregular Retention Behavior and Effect of Silanol Masking", *J. Chromatogr.*, **203**(1981)65.
- 9 - Unger, K.K., "Porous Silica", Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1979.
- 10 - Rigney, M.P.; Funkenbusch, E.F. e Carr, P.W., "Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia", *J. Chromatogr.*, **499**(1990) 291.
- 11 - Poole, C.F. e Poole, S.K., "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1991.
- 12 - Yu, J. e El Rassi, Z., "Reversed-Phase Liquid Chromatography with Microspherical Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases", *J. Chromatogr.*, **631**(1993)91.
- 13 - Trüdinger, U.; Müller, G. e Unger, K.K., "Porous Zirconia and Titania as Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **535**(1990)111.

- 14 - Rigney, M.P.; Weber, T.P. e Carr, P.W., "Preparation and Evaluation of a Polymer-Coated Zirconia Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **484**(1989)273.
- 15 - Weber, T.P., Carr, P.W. e Funkenbusch, E.F., "Evaluation of a Zirconia-Based Carbon-Polymer Composite Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **519**(1990)31.
- 16 - Yu, J. e 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.
- 17 - Schafer, W.A.; Carr, P.W.; Funkenbusch, E.F. e Parson, K.A., "Physical and Chemical Characterization of a Porous Phosphate-Modified Zirconia Substrate", *J. Chromatogr.*, **587**(1991)137.
- 18 - Kawahara, M.; Nakamura, H. e Nakajima, T., "Titania and Zirconia: Possible New Ceramic Microparticulates for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **515**(1990) 149.
- 19 - Elestad, O.H. e Blindheim, V., "Reaction of Titanium Tetrachloride with Silica Gel Surfaces", *J. Mol. Catal.*, **33**(1985)275.
- 20 - Verzele, M., "Trace Metals in Silica Gel Based HPLC Packing Materials", *LC*, **1**(1991)217.
- 21 - Hetem, M.J.J., "A Fundamental Study of Chemically Modified Silica Surfaces in Chromatography", Tese de Doutorado, Eindhoven University of Technology, 1990.
- 22 - Nawrocki, J.; Rigney, M.P.; McCormick, A. e Carr, P.W., "Chemistry of Zirconia and its Use in Chromatography", *J. Chromatogr.*, **657**(1993)229.
- 23 - Kurganov, A.; Davankov, V.; Isajeva, T.; Unger, K. e Eisenbeiss, F., "Characterization of Covalently Bonded and Adsorbed Polymer Coatings on Silica, Alumina and Zirconia by Means of Physico-Chemical and Chromatographic Methods", *J. Chromatogr.*, **660 A**(1994) 97.

- 24 - Reeder, D.H.; Li, J.; Carr, P.W.; Flickinger, M.C. e McCormick, A.V., "Models for Polybutadiene Pore Wall Coatings in Porous Zirconia", *J. Chromatogr. A*, **760**(1997)71.
- 25 - Li, J. e Carr, P.W., "Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene-Coated Zirconia", *Anal. Chem.*, **69**(1997)2202.
- 26 - Li, J. e Carr, P.W., "A Study of the Efficiency of Polybutadiene-Coated Zirconia as a Reversed-Phase Chromatographic Support", *Anal. Chem.*, **69**(1997)2193.
- 27 - Clausen, A.M. e Carr, P.W., "Chromatographic Characterization of Phosphonate Analog EDTA-Modified Zirconia Support for Biochromatographic Applications", *Anal. Chem.*, **70**(1998)378.
- 28 - Chicz, R.M.; Shi, Z. e Regnier, F.E., "Preparation and Evaluation of Inorganic Anion-Exchange Sorbents not Based on Silica", *J. Chromatogr.*, **359**(1986)121.
- 29 - Peixoto, C.R.M.; Gushikem, Y. e 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.
- 30 - Gushikem, Y., Peixoto, C.R.M., e Kubota, L.T., in "New Developments in Ion Exchange Materials. Fundamentals and Applications", eds. Abe, M., Kataoka, T., e Suzuki, T., Kodasha-Elsevier, Tokyo, 1991, p. 607.
- 31 - da Cunha, L.J.V.; Andreotti, E.I.S. e Gushikem, Y., "Zirconium (IV) Oxide Coated Silica Gel Surface as a Base for Copper Hexacyanoferrate Immobilization", *J. Braz. Chem. Soc.*, **6**(1995)271.
- 32 - Peixoto, C.R.M.; Kubota, L.T. e Gushikem, Y., "Use of Ruthenium-(Ethylenedinitrito)-tetraacetic Acid Monohydrate Ion Immobilized on Zirconium (IV) Oxide Coated Silica Gel Surface As an Amperometric Sensor for Oxygen in Water", *Anal. Proc. Anal. Commun.*, **32**(1995)503.
- 33 - Swallow, A.J., "Radiation Chemistry - An Introduction", Longman., London, 1973.
- 34 - Spinks, J.W.T.; Woods, R.J., "An Introduction to Radiation Chemistry", 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- 35 - Petrarch Systems Silanes & Silicones, catálogo de produtos, 1989.

- 36 - Haken, J.K., "Polysiloxane Stationary Phases", *J. Chromatogr.*, **73**(1972)419.
- 37 - Denaro, A.R.; Jayson, G.G., "Fundamentals of Radiation Chemistry", Ann Arbor Science Publishers Inc., London, 1972.
- 38 - Schnabel, W., "Polymer Degradation, Principles and Practical Applications", Hanser International, Wien, 1981.
- 39 - Anazawa, T.A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1992.
- 40 - Anazawa, T.A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, Tipo C8, para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1996.
- 41 - Verzele, M. e Dewaele, C., "Low-Viscosity Solvent Packing of HPLC Columns Using the "Up-Tube" Packing Procedure", *LC-GC*, **4**(1986)614.
- 42 - Majors, R.E., "Slurry Packing Microparticulate Columns", *LC*, **2**(1984)502.
- 43 - Snyder, I.R.; Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2ª edição, John Wiley and Sons, New York, 1979.
- 44 - Braithwaite, A.; Smith, F.J., "Chromatographic Methods", 4ª edição, Chapman and Hall, London, 1985.
- 45 - Cabrera, K.; Arras, R.; Lubda, D.; Krebs, K.F. e Wieland, G.F., "Preparation and Chromatographic Characterization of a New Stationary Phase for Reversed-Phase HPLC Based on a High-Purity Silica", *Am. Lab.*, **29**(4)(1997)44.
- 46 - Anazawa, T.A. e 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.
- 47 - Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E. 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. A*, **697**(1995)159.

- 48** - Hespanhol, M.C., "Estudo da Imobilização, via Radiação Gama, da Fase Estacionária Líquida, Polimetiloctadecilsiloxano, sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1993.
- 49** - Zuin, C.F., "Preparação e Avaliação de Fase Estacionária C8 a partir de Sílica Modificada", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1998.
- 50** - Silva, R.B., "Preparação de Fases Estacionárias a partir do Poli(metiloctilsiloxano) sorvido sobre a Sílica Titanizada para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., em andamento.
- 51** - Silva, G.M.F.; Collins, K.E. e Jardim, I.C.S.F., "Development of a C-18 Stationary Phase Using Zirconized Silica as Support", 7th Latin-American Congress on Chromatography and Related Techniques, Águas de São Pedro, S.P., Brasil, 1998, P-207.
- 52** - Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Souza, J.B.; Collins, K.E. e Jardim, I.C.S.F., "Polimento da Parede Interna de Aço Inoxidável para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", 14^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambu, M.G., 1991, QA-010.
- 53** - Cabrera, K., comunicação pessoal.
- 54** - Phase Separations, catálogo de produtos, 1996.

*"Depois de escrever, leio...
Por que escrevi isto?
Onde fui buscar isto?
De onde me veio isto?
Isto é melhor do que eu..."*
(Fernando Pessoa)