



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



KÁTIA ALCAIDE GOMES

**PROPOSTA DE UM NOVO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO RÁPIDA DA VIDA ÚTIL
DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

ITUIUTABA/MG

2020

KÁTIA ALCAIDE GOMES

**PROPOSTA DE UM NOVO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO RÁPIDA DA VIDA ÚTIL
DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

Monografia de conclusão de curso
apresentada à Comissão Avaliadora como parte
das exigências do Curso de Graduação em
Química: Bacharelado, do Instituto de Ciências
Exatas e Naturais do Pontal da Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA/MG

2020

KÁTIA ALCAIDE GOMES

**PROPOSTA DE UM NOVO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO RÁPIDA DA VIDA ÚTIL
DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

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

Ituiutaba, 14 de dezembro de 2020

COMISSÃO AVALIADORA

Profa. Dra. Fabiana Aparecida Marques / IF Goiano, *campus* Ceres

MSc. Marcos Vinícius Ferreira

Prof. Dr. André Luiz dos Santos

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por toda força, sabedoria e coragem para que eu pudesse realizar meus sonhos. Meus eternos agradecimentos.

Aos meus pais Marli e Lorivaldo, por terem proporcionado a oportunidade de seguir meus sonhos, por todo o amor e apoio incondicional por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Aos meus irmãos José Augusto, Sandy e Elton que sempre estiveram do meu lado me apoiando em tudo.

Ao Prof. Dr. Anizio Marcio, pela sua orientação e oportunidade de participar do grupo de pesquisa CROMAT, por todos os ensinamentos e apoio antes e durante toda a minha iniciação científica.

Ao Allyson pela sua amizade, companheirismo, paciência e toda ajuda para eu chegar até aqui.

A todos os amigos do grupo de pesquisa, Allyson, Lais, Andressa, Giselle, Carlão, Ana Maria, pelos incentivos, troca de ideias e apoio.

Aos meus amigos que fiz aqui Náiad, Rafaela, Eduarda, Lais, Camila, Joao Victor, Gabriela, Renan, que permaneceram ao meu lado por todo esse tempo.

Aos meus amigos de laboratório, Marcos, Cynthia, Diele, Lauro, Letícia, Ana Clara, Mateus, Naiara, Mayara, por todos os ensinamentos que eles passaram e pelos momentos de descontração.

A todos os professores e técnicos do Curso de Química o meu muito obrigado por todo conhecimento compartilhado durante essa trajetória.

À FAPEMIG pela bolsa concedida e à FINEP pelo suporte financeiro para a infraestrutura do laboratório de pesquisa e de equipamentos multiusuários.

A todos que colaboraram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e da minha formação. Muito Obrigada!

RESUMO

Um dos maiores problemas relacionados às fases estacionárias tradicionais da cromatografia líquida de alta eficiência, as fases C_{18} quimicamente ligadas baseadas em sílica, é a sua estabilidade química limitada em uma faixa de pH 2-8. Nos últimos dez anos, o Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia (CroMat) vem produzindo fases estacionárias por um método mais simples e de menor custo, baseado na imobilização de polímeros em óxidos inorgânicos. No entanto, a estabilidade desses materiais ainda é desconhecida, uma vez que a avaliação convencional da vida útil das fases requer o consumo de grande quantidade de solvente orgânico na fase móvel e longo tempo de funcionamento do cromatógrafo. Desta forma, neste trabalho buscou-se desenvolver um método de degradação rápida de colunas cromatográficas, visando avaliar em um curto intervalo de tempo a vida útil das fases estacionárias. Condições de análise que levam a degradação da fase estacionária foram estudadas como pH da fase móvel, tipo de solução tampão, concentração de aditivos e temperatura de coluna. O efeito dessas condições foi avaliado através de parâmetros cromatográficos de compostos em uma mistura teste padrão separada periodicamente sempre por um mesmo lote de fase comercial C_{18} . As condições dessas variáveis que resultaram em uma rápida degradação da fase estacionária, porém capaz de diferenciar materiais com estabilidades próximas, foram fixadas definindo o método de degradação rápida. O método foi empregado para avaliar a estabilidade de fases estacionárias preparadas pelo CroMat baseadas em suporte de sílica e de sílica aluminizada. A fase Si(PEO) foi a que apresentou maior estabilidade dentre as fases à base de sílica avaliadas, sendo a que apresentava também a camada polimérica mais hidrofílica dos materiais analisados. As fases baseadas em suportes de sílica aluminizada não foram destruídas pelo método dentro do período de 24 h, mostrando uma estabilidade elevada em função da presença de alumina no material de suporte. Desta forma, conclui-se que foi possível desenvolver um método de degradação de fases estacionárias para cromatografia líquida rápida, com duração total de 24 h, possibilitando analisar as estabilidades tanto de fases preparadas em laboratório quanto de fases comerciais. Este método permitiu ainda definir a vida útil de cada fase estacionária preparada no CroMat nos últimos dez anos.

Palavras-chave: Cromatografia líquida, fase estacionária, imobilização polimérica, estabilidade química, degradação rápida.

ABSTRACT

One of the principal problems related to the traditional stationary phases of high-performance liquid chromatography, the C₁₈ chemically bonded silica phases, is their limited chemical stability in a pH range of 2-8. In the last ten years, the Research Laboratory in Separation Materials and Chromatography (CroMat) has been producing stationary phases by a simpler and lower cost method, based on the polymer immobilization in inorganic oxide particles. However, the stability of these materials is still unknown, since the conventional assessment of the stationary phase lifetime requires the consumption of a large volume of mobile phase and a long operating time of the chromatograph. Thus, in this work we sought to develop a method of rapid degradation of chromatographic columns, aiming to evaluate in a short period of time the stationary phase lifetime. Analysis conditions that lead to the stationary phase degradation were studied as mobile phase pH, type of buffer solution, additive concentration, and column temperature. Each effect of these conditions was evaluated using chromatographic parameters of compounds in a standard test mixture periodically separated by the same batch of commercial C₁₈ phase. The conditions of these variables, which resulted in rapid degradation of the stationary phase, but capable of differentiating materials with close stability, were fixed defining the rapid degradation method. The method was used to evaluate the stability of stationary phases prepared by CroMat based on silica and aluminized silica. The Si(PEO) phase showed the greatest chemical stability among the silica-based phases evaluated, and the one that also had the most hydrophilic polymer layer of the analyzed materials. The stationary phases based on aluminized silica supports were not destroyed by the method within the 24 h, showing high stability due to the presence of alumina in the support material. Thus, it was concluded that it was possible to develop a method of rapid degradation of HPLC stationary phases, within 24 h, making it possible to analyze the stability of both lab-made and commercial phases. This method also allowed to define the lifetime of each stationary phase prepared in CroMat in the last ten years.

Keywords: Liquid chromatography, stationary phase, polymer immobilization, chemical stability, rapid degradation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa. _____ 15
- Figura 2.** a) Fases estacionárias C_{18} quimicamente ligadas e b) fases estacionárias imobilizadas por polissiloxanos. _____ 19
- Figura 3.** Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica com as fases estacionárias. _____ 24
- Figura 4.** Cromatograma de separação de misturas por cromatografia líquida de alta eficiência e as informações de medidas dos picos. _____ 26
- Figura 5.** Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste empregada na avaliação da estabilidade das fases estacionárias. a) Uracila, b) benzonitrila, c) benzeno, d) tolueno e e) naftaleno. _____ 30
- Figura 6.** Cromatograma da separação dos compostos da mistura teste. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH: H_2O (60:40, v/v) com vazão de $0,4\text{ mL min}^{-1}$ e detecção a 254 nm. _____ 31
- Figura 7.** Efeito do pH da fase móvel na estabilidade da fase estacionária C_{18} comercial em termos de números de pratos para o pico do naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH: solução fosfato $0,050\text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v) com vazão de $0,4\text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e detecção UV a 254 nm. _____ 33
- Figura 8.** Fator de retenção obtido na degradação da fase estacionária C_{18} variando o pH da fase móvel. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050\text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v), vazão $0,4\text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e detecção UV a 254 nm. _____ 34
- Figura 9.** Variação da resolução da fase estacionária C_{18} para os picos do naftaleno e tolueno na mistura teste em diferentes condições de pH da fase móvel. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050\text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v), vazão $0,4\text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e detecção UV a 254 nm. _____ 35
- Figura 10.** Variação do número de pratos do pico do naftaleno em uma coluna C_{18} avaliada em diferentes condições de temperaturas de coluna. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050\text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4\text{ mL min}^{-1}$ e detecção UV a 254 nm. _____ 37
- Figura 11.** Variação do número de pratos do pico do naftaleno da mistura teste padrão na fase estacionária C_{18} em função do tipo de tampão empregado na fase móvel. Condições

utilizadas: MeOH:0,050 mol L⁻¹ de tampão, pH 10 (60:40 v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 39

Figura 12. Efeito da concentração da fase móvel na estabilidade da fase estacionária C₁₈ comercial em termos de números de pratos para o pico do naftaleno da mistura teste padrão. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 40

Figura 13. Variação do número de pratos em uma fase C₁₈ quimicamente ligada comercial sob diferentes composições da fase móvel constituída de solução fosfato. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (variação da porcentagem de solvente aquoso), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _ 41

Figura 14. Imagens por MEV das partículas da fase estacionária C₁₈ comercial a) antes e b) após o estudo de degradação rápida, empregando as condições definidas no desenvolvimento do método. _____ 43

Figura 15. Cromatograma da separação da mistura teste padrão a) antes e b) após o estudo de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. 44

Figura 16. Imagens da fase estacionária C₁₈ comercial dentro da coluna cromatográfica, (a) antes e (b) após o estudo de degradação. _____ 45

Figura 17. Curva TG obtida para a fase estacionária C₁₈ antes e após a aplicação do método de degradação. _____ 45

Figura 18. Estabilidade das fases estacionárias Si(PGPMS), Si(PDAS), Si(PEO) e uma fase C₁₈ comercial a partir da aplicação do método de degradação rápida de FE monitorando o número de pratos para o pico do naftaleno na mistura teste padrão. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 48

Figura 19. Variação do fator de retenção para o pico do naftaleno nas fases Si(PDAS), Si(PGPMS) e Si(PEO), utilizando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 49

Figura 20. Resolução entre os picos do tolueno e do naftaleno na separação da mistura teste padrão pelas fases estacionárias Si(PGPMS) e Si(PDAS), utilizando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10. _____ 50

Figura 21. Variação do número de pratos para o pico do naftaleno obtido na separação da mistura teste padrão pelas fases estacionárias SiAl(PEO), SiAl(PDAS) e C₁₈, empregando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 51

Figura 22. Comparação entre as estabilidades químicas das fases imobilizadas sobre sílica e sílica aluminizada, utilizando o método de degradação rápida a partir do monitoramento do número de pratos para o pico do naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 52

Figura 23. Variação do fator de retenção para o pico do naftaleno nas fases SiAl(PDAS) e SiAl(PEO), empregando o método de degradação de fases estacionárias. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 53

Figura 24. Variação da resolução entre os picos do tolueno e naftaleno na fase SiAl(PDAS), utilizando o método de degradação rápida de fases estacionárias. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm. _____ 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e seus níveis estudados no desenvolvimento de um método de degradação rápida de fases estacionárias para CLAE-FR.....	27
Tabela 2. Propriedades morfológicas da fase estacionária C ₁₈ quimicamente ligada antes e após o estudo de degradação.	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASAP	Analizador de área superficial e porosidade
BET	Método Brunauer, Emmett e Teller
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FN	Cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase normal
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa
CroMat	Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
K	Fator de retenção
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	Número de pratos
ODS	Octadecilsilano
PBD	Poli(butadieno)
PDAS	Poli(dimetil- <i>co</i> -alquilmetilsiloxano)
PGPMS	Poli(glicidoxipropilmetil- <i>co</i> -dimetilsiloxano)
PEO	Poli(óxido de etileno)
r.p.m.	Rotações por minuto
R _s	Resolução
SiAl	Sílica aluminizada
TGA	Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Suportes cromatográficos	14
1.1.1 Suportes cromatográficos alternativos	16
1.2 Imobilização polimérica sobre o suporte cromatográfico	18
1.3 Fatores que aceleram a degradação da coluna cromatográfica	20
2 OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Materiais, reagentes, vidrarias e equipamentos	23
3.2 Preparação das fases estacionárias para avaliação da estabilidade	23
3.2.1 Enchimento das colunas cromatográficas com as fases estacionárias	24
3.2.2 Condicionamento das colunas cromatográficas	25
3.3 Preparação da fase móvel	25
3.4 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias	26
3.5 Desenvolvimento do método de degradação rápida de fases estacionárias	27
3.6 Caracterização físico-química da fase estacionária C ₁₈	28
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura	28
3.6.2 Análise de área superficial específica e porosidade	28
3.6.3 Análise termogravimétrica	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Avaliação preliminar da fase estacionária C ₁₈	30
4.2 Desenvolvimento do método de degradação rápida das fases estacionárias	31
4.2.1 Efeito do pH na vida útil das fases estacionárias	32
4.2.2 Efeito da temperatura de coluna	36
4.2.3 Efeito do uso de soluções tampão	38
4.3 Caracterização físico-química da fase C ₁₈ antes e após o estudo de degradação	42
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura	42
4.3.2 Área superficial específica e porosidade	43
4.3.3 Análise termogravimétrica	45
4.4 Avaliação da estabilidade de FE aplicando o método de degradação rápida	46

4.4.1 Efeito do tipo de polímero na vida útil das FE imobilizadas com polímero	47
4.4.2 Efeito do tipo de suporte cromatográfico na vida útil das FE	50
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais versátil e mais abrangente para análise de misturas de compostos das mais variadas estruturas químicas. A CLAE vem ocupando um lugar proeminente dentro das técnicas mais utilizadas para fins analíticos, abrangendo tanto as análises qualitativas como quantitativas. Em CLAE, os compostos são separados de acordo com suas modalidades cromatográficas.

O processo cromatográfico consiste, essencialmente, na passagem de uma fase móvel (FM) através de 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 estacionária. A fase móvel é bombeada sob alta pressão e a uma vazão controlada. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna até o detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A fase estacionária (FE) é o componente mais importante do sistema CLAE, pois é nela que ocorrem todos os processos químicos e físico-químicos de separação durante a análise dos componentes de uma amostra. A principal modalidade da CLAE é a cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR), na qual a fase estacionária é constituída de uma camada fortemente apolar enquanto a fase móvel emprega solventes orgânicos misturados à água (CHESTER, 2012).

A CLAE-FR concentra mais de 85 % das aplicações da cromatografia líquida, principalmente, por permitir a análise de substâncias desde moderadamente polares até altamente apolares, com alta eficiência e em tempos relativamente curtos (BUSZEWSKI; NOGA, 2012). As fases reversas utilizam como fase móvel (FM), solventes menos tóxicos e mais baratos, como água e metanol, quando comparadas ao modo de fase normal; tendem a adquirir rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; possuem boa reprodutibilidade dos tempos de retenção; são compatíveis com eluição por gradiente, resultando em melhor separação e rapidez nas análises (TONHI *et al.*, 2002). Esta ampla utilização está associada principalmente ao contínuo desenvolvimento das suas fases estacionárias empregadas na análise de compostos das mais diversas características, tais como: fármacos, medicamentos, alimentos, polímeros sintéticos, entre outras (JANDERA, 2011).

As fases estacionárias reversas são constituídas de espécies orgânicas apolares ligadas quimicamente, imobilizadas ou apenas sorvidas a um suporte cromatográfico, normalmente um óxido inorgânico. As diferentes combinações entre as espécies orgânicas e a variedade de óxidos

inorgânicos resultam em fases estacionárias com diferentes seletividades, sendo capazes de determinar compostos com diferentes polaridades (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

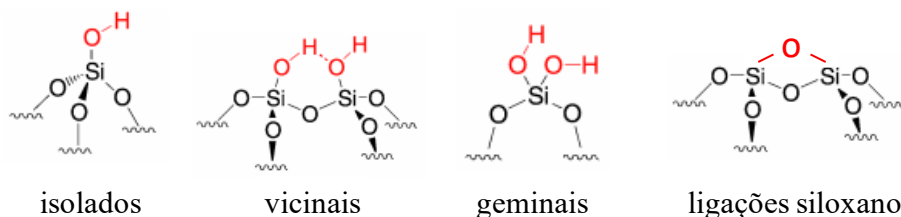
1.1 Suportes cromatográficos

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

- ✓ Ser suficientemente poroso, permitindo que o líquido estacionário seja absorvido pelos seus poros;
- ✓ Possuir altas concentrações de grupos ativos em sua superfície para facilitar a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação do mesmo;
- ✓ Ter uma área superficial suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra;
- ✓ Possuir resistência mecânica elevada, para que o suporte seja capaz de resistir às altas pressões necessárias em CLAE-FR;
- ✓ Apresentar inércia química, para não reagir com os componentes da amostra.

Os primeiros materiais empregados como suportes cromatográficos foram os óxidos inorgânicos de silício (SiO_2 , sílica) e de alumínio (Al_2O_3 , alumina). Partículas esféricas da sílica amorfa são os materiais mais utilizados como suporte devido à sua alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez, eficiência elevada obtida nas separações cromatográficas de diversas substâncias e a facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos hidroxilas (silanóis) altamente reativos (SILVA *et al.*, 2004). A sílica contém em sua superfície pelo menos três tipos distintos de grupos ativos (Figura 1), tais como silanóis isolados ou livres, vicinais e geminais que conferem ao material uma elevada acidez superficial, além das ligações siloxano (BERTHOD, 1991).

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



Fonte: (SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014)

A facilidade de modificação das partículas de sílica é uma característica extremamente importante para o desenvolvimento das fases do tipo siloxano nas colunas cromatográficas para CLAE-FR. Estas fases são constituídas de agentes sililantes, tais como o octadecilsilano (C_{18}) e o octilsilano (C_8), ligados quimicamente aos grupos silanóis da sílica. A principal vantagem das fases do tipo siloxano é a formação de ligações altamente estáveis do tipo $-Si-O-Si-$ entre os agentes sililantes e os grupos silanóis que conferirem uma maior estabilidade química às fases estacionárias com a passagem de eluentes sob alta pressão (KIRKLAND, 2004). Atualmente, as FE C_{18} se tornaram o material universal para a cromatografia líquida de fase reversa, uma vez que todos os fabricantes de colunas cromatográficas para CLAE possuem pelo menos um tipo de coluna C_{18} no rol de seus principais produtos comerciais.

Apesar de todo avanço tecnológico alcançado com as fases quimicamente ligadas de C_{18} na CLAE-FR, uma grande dificuldade na preparação desses materiais ainda persiste: o recobrimento incompleto da superfície da sílica com os grupamentos organossilanos, resultando em um material com parte da superfície da sílica exposta ao contato com a fase móvel (CHESTER, 2012; KIRKLAND, 2004; NAWROCKI *et al.*, 2004). Esse recobrimento incompleto está associado ao impedimento estérico causado pela ligação química de moléculas volumosas de C_{18} em grupos ativos adjacentes na superfície da sílica (MEYER, 2010).

Desta forma, as FE quimicamente ligadas à base de C_{18} baseadas em suportes de sílica são suscetíveis ao ataque pela fase móvel, reduzindo sua vida útil e limitando maiores campos de aplicações. Como a sílica é solúvel em soluções ligeiramente alcalinas e a velocidade de dissolução aumenta com o aumento do pH, fases estacionárias quimicamente ligadas de C_{18} são empregadas em fase móvel até pH 8, deixando de analisar diversas substâncias com características básicas (tais como várias classes de fármacos, de agrotóxicos, de biomoléculas etc.) que requerem condições mais alcalinas de separação (MEYER, 2010; NAWROCKI *et al.*, 2004). Outro problema ainda persistente nas fases C_{18} é sua limitação de análise em condições mais ácidas de fase móvel, pois em pH menor que 2 a ligação Si-C estabelecida entre a sílica e as

moléculas C_{18} são hidrolisadas, destruindo o leito cromatográfico (KIRKLAND, 2004; CLAESSENS; VAN STRATEN, 2004). Logo, fases C_{18} baseadas em suportes de sílica são limitadas ao uso em CLAE-FR cujas condições estejam fora da faixa de pH 2 a 8.

1.1.1 Suportes cromatográficos alternativos

Em alternativa a sílica, visando estender a faixa de pH para aplicação das fases estacionárias reversas, alguns materiais vêm sendo propostos como suportes cromatográficos, tais como alguns óxidos metálicos.

Dentre os primeiros óxidos metálicos empregados como suportes alternativos que foram sintetizados e comercializados se destaca a alumina. O óxido de alumínio, comumente chamado de alumina, foi muito utilizado na cromatografia líquida de fase normal (CLAE-FN), na qual a FE é mais polar que a FM. A principal vantagem da alumina é a sua estabilidade química em uma faixa de pH de 1 a 13, a tornando-a altamente atrativa como substituta da sílica (PESEK; MATYSKA, 2002).

Várias FE baseadas em alumina foram preparadas e comercializadas, seja pela modificação química do suporte com reagentes sililantes (NAWROCKI *et al.*, 2004) ou por recobrimento das partículas com polímeros orgânicos (MAO; FUNG, 1997). Apesar das FE à base de alumina terem apresentado estabilidade numa faixa de pH mais ampla, em muitos casos as propriedades de retenção não foram significativamente diferentes quando comparadas a materiais similares de sílica. No entanto, o baixo desempenho cromatográfico nas separações obtido com fases baseadas em suportes de alumina aliado à disponibilidade comercial limitada de formas, tamanhos e grau de porosidades das partículas contribuíram para a modesta difusão da alumina como suporte cromatográfico (NAWROCKI *et al.*, 2004; BUCHMEISER, 2001; JARONIEC C; JARONIEC M; KRUK, 1998).

Outro material que tem sido amplamente empregado como suporte alternativo à sílica é o óxido de zircônio, a zircônia (ZrO_2). A elevada estabilidade deste óxido metálico em quase toda a faixa de pH e em temperaturas mais extremas ($> 150\text{ }^{\circ}C$) têm sido um dos focos de interesse dos cromatografistas (NAWROCKI *et al.*, 2004; GRUN *et al.*, 1996).

A zircônia (ZrO_2) é um óxido anfótero, com propriedades de trocador de ânions e cátions devido aos grupos hidroxilas superficiais, quando em soluções neutras e ácidas ou alcalinas, respectivamente (NAWROCKI *et al.*, 2004; DUNLAP *et al.*, 2001). A estabilidade intrínseca do suporte de zircônia faz dele a melhor escolha para separações da CLAE-FR em condições extremas de pH (> 11) ou de temperatura ($> 60\text{ }^{\circ}C$) (NAWROCKI *et al.*, 2004; DUNLAP *et al.*,

2001). Dentre as principais fases reversas empregando a zircônia como suporte, destacam-se as fases de zircônia-poli(butadieno) (zircônia-PBD) (LI; HUE; CARR, 1997; LI; CARR, 1997) e zircônia octadecilsilano (zircônia-ODS) (MAJORS, 1993; WEBER; CARR, 1999). As fases estacionárias de zircônia-PBD foram extensivamente estudadas e aplicadas a diferentes compostos, tais como substâncias polares e apolares, proteínas e peptídeos, permitindo rápidas separações e estabilidade acima de cinco mil volumes de coluna com a passagem de fase móvel metanol:NaOH a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (DUNLAP *et al.*, 2001). A zircônia-PBD também exibiu retenção, seletividade e eficiência similares a fases comerciais ODS (sílica-octadecilsilano) para alguns analitos (LI; HUE; CARR, 2001). Partículas de zircônia-PBD também apresentaram mecanismos de retenção similares àqueles observados em fases quimicamente ligadas baseadas em sílica (STELLA *et al.*, 2001).

Apesar da obtenção de FE altamente estáveis com suportes de zircônia, este material apresenta uma desvantagem. A sua superfície apresenta, sob determinadas condições, sítios ativos (átomos de Zr(IV) que se encontram coordenadamente insaturados) que se comportam como ácidos fortes de Lewis. Desta forma, analitos contendo em sua estrutura bases fortes de Lewis podem interagir fortemente com estes sítios produzindo picos cromatográficos com caudas acentuadas. Um outro aspecto desfavorável ao uso deste material como suporte é a necessidade de se evitar a presença de dióxido de carbono, tanto na fase móvel quanto na amostra, pois sua ligação com o dióxido de zircônio pode alterar as propriedades do suporte durante as análises, afetando os parâmetros de retenção (NAWROCKI *et al.*, 1993).

A titânia, óxido de titânio (TiO_2), também foi outro óxido metálico explorado como suporte para cromatografia líquida de fase reversa. Da mesma forma que a alumina e a zircônia, a titânia apresenta estabilidade química na faixa de pH de 1 a 13 e possui grupos hidroxilas superficiais que fornecem características anfóteras ao óxido. A titânia se comporta como trocadora de ânions em meio ácido e como trocador de cátions em meio alcalino (TANI; SUZUKI, 1994). De uma forma geral, fases estacionárias reversas baseadas em titânia- C_{18} foram produzidas e avaliadas na separação de diversas substâncias, tendo comportamento cromatográfico similar a fases C_{18} à base de sílica (TANI; SUZUKI, 1996; ZIZKOVSKY *et al.*, 2008). Porém, semelhantemente às fases reversas a base de zircônia fortes interações com compostos básicos e ácidos e desempenhos inferiores às fases a base de sílica restringiram as aplicações da titânia como suporte cromatográfico para fases reversas. Este desempenho inferior, tanto para a alumina como para a zircônia e a titânia, foi associado às características morfológicas desses óxidos que apresentaram estrutura de poros distinta da sílica, a qual é adequada para processos de separação (JARONIEC C; JARONIEC M; KRUK, 1998).

Com as limitações de uso dos óxidos metálicos como suportes alternativos à sílica (KURGANOV *et al.*, 1994), apesar da elevada estabilidade química oferecida pelos mesmos, uma alternativa encontrada para aproveitar as principais características de cada óxido foi a preparação de óxidos mistos: a sílica com um óxido metálico (DUN *et al.*, 2004; COLLINS *et al.*, 2009; SILVA; COLLINS, 2012; SILVA; COLLINS 2013; SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014). Nesse tipo de suporte cromatográfico as partículas de sílica são recobertas com camadas de óxidos metálicos, resultando em um material mais estável quimicamente (devido ao óxido metálico) com a estrutura morfológica altamente favorável aos processos de separação (devido à sílica). De fato, as fases estacionárias baseadas em suportes de óxidos mistos apresentaram maior estabilidade química que suas similares baseadas em suportes de sílica nua, porém sem perda de eficiência e resolução cromatográfica (SILVA *et al.*, 2006).

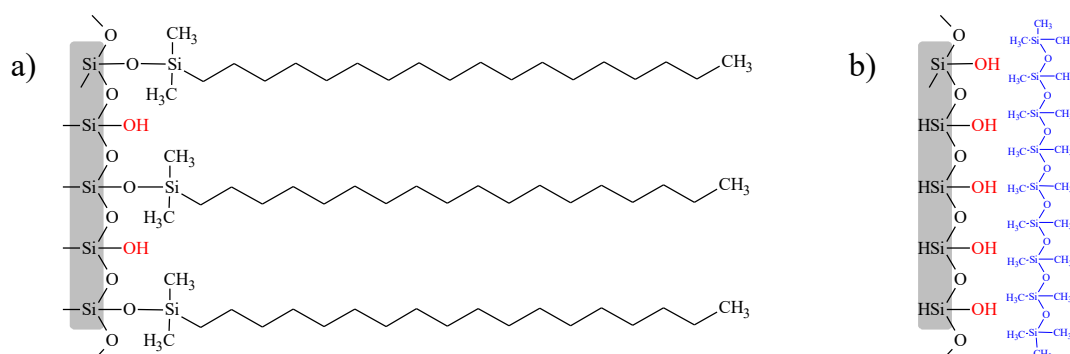
No Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia (CroMat) da Universidade Federal de Uberlândia, um novo suporte cromatográfico foi produzido a partir da deposição de uma monocamada de nanopartículas de alumina, sintetizadas no interior de micelas de surfactantes, sobre a superfície da sílica cromatográfica (SILVEIRA; DIB; FARIA, 2014). Até então, devido à aglomeração das partículas quando se empregava alumina a possibilidade de combiná-la à sílica havia sido relegada a um segundo plano, apesar de ser óxido metálico com características morfológicas e de desempenho cromatográfico mais próximas da sílica. As fases produzidas no CroMat com este suporte (SANTOS, 2016; SOUZA, 2016), no entanto, ainda não tiveram suas estabilidades avaliadas para verificar o efeito da presença da alumina na vida útil das colunas cromatográficas.

1.2 Imobilização polimérica sobre o suporte cromatográfico

Além da modificação do suporte cromatográfico, outras estratégias para contornar as limitações das fases estacionárias comerciais quimicamente ligadas têm sido estudadas. Muitas dessas são baseadas na modificação do agente ligante organossilano ou na incorporação de outros grupamentos na fase estacionária (KIRKLAND, 2004; CLAESSENS; VAN STRATEN, 2004; COYM, 2008). Porém, nenhuma dessas estratégias conseguiu minimizar significativamente o problema de impedimento estérico causado na modificação da sílica com as moléculas C₁₈. Uma estratégia interessante para o aumento da estabilidade das fases estacionárias para CLAE-FR foi a substituição da ligação química do agente organossilano pela imobilização física de polissiloxanos sobre o óxido inorgânico (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

A imobilização polimérica tem permitido um melhor recobrimento da superfície da sílica, uma vez que nesse processo ocorre um encapsulamento da partícula da sílica ao invés da ligação química por meios dos seus sítios ativos (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009; JARDIM *et al.*, 2010), Figura 2. Desta forma, as FE podem ser aplicadas em uma faixa mais ampla de pH, pois a superfície da sílica estará melhor protegida do ataque de fases móveis, sejam essas ácidas ou básicas. Além disso, as FE com imobilização polimérica são também vantajosas economicamente, uma vez que os polímeros apresentam custos substancialmente mais baixos que os reagentes organossilanos, tornando as colunas cromatográficas, reconhecidamente de alto custo, mais acessíveis financeiramente (SOUZA, 2016).

Figura 2. a) Fases estacionárias C_{18} quimicamente ligadas e b) fases estacionárias imobilizadas por polissiloxanos.



Fonte: Própria autora

Um dos principais procedimentos de imobilização polimérica é o tratamento térmico, que consiste no aquecimento, por condução de calor, do recipiente contendo o material de suporte cromatográfico e o polímero. O tratamento térmico é utilizado para acelerar a imobilização do polímero no suporte de sílica, auxiliando no processo de auto-imobilização (BOTTOLI *et al.*, 2004). A auto-imobilização é um processo lento da imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário um considerável período para que as moléculas do polímero se reorganizem de maneira a formarem uma camada estável e uniforme sobre a superfície do suporte cromatográfico. O período para que ocorra a imobilização de forma irreversível depende do tipo de material a ser utilizado como suporte cromatográfico e do tipo de polímero (BOTTOLI, 2002).

A imobilização polimérica além de acelerar o processo de auto-imobilização é responsável também pela fixação do polímero no suporte, promovendo inclusive ligações químicas com os grupos ativos superficiais do suporte (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009; JARDIM *et al.*, 2010; GAMA, 2017). Além do tratamento térmico, processos de imobilização via radiação micro-ondas também foram estudados como uma forma ainda mais rápida de se

obter a fase estacionária imobilizada (LOPES; COLLINS; JARDIM, 2004; BEGNINI; JARDIM, 2013). Neste processo de imobilização a obtenção da fase estacionária ocorre em poucos minutos ao invés de várias horas como no tratamento térmico (CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016).

Uma das principais vantagens das fases estacionárias imobilizadas por polímeros é a sua seletividade, que pode ser ajustada finamente de acordo com o grupo funcional presente no monômero. Desta forma, diversos polímeros já foram e vêm sendo imobilizados sobre suportes cromatográficos, visando a separação de classes de compostos distintas (ZHANG *et al.*, 2013; DIB; FARIA, 2014; CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016).

A estabilidade hidrolítica das fases imobilizadas por polímeros tem se apresentado similares a colunas comerciais recheadas com fases quimicamente ligadas (FARIA *et al.*, 2007). No entanto, processos efetivos de avaliação da vida útil dessas fases estacionárias requerem a análise dos parâmetros cromatográficos estabelecidos no material de recheio com a passagem contínua de fase móvel de forma ininterrupta. Em condições normais de fase móvel, ou seja, composta por metanol e água e sem aditivos, esse processo pode levar mais de 6 meses, colocando em risco o funcionamento do equipamento devido ao uso excessivo e, particularmente, resultando em um enorme volume de resíduos orgânicos tóxicos (FONSECA *et al.*, 2004; KIRKLAND, 2004).

1.3 Fatores que aceleram a degradação da coluna cromatográfica

A estabilidade de fase estacionária quimicamente ligada à base de sílica pode ser avaliada quanto a diferentes condições de pH da fase móvel, temperatura, concentração de tampões e/ou aditivos na fase móvel, vazão e composição da fase móvel. Essas condições são testadas com a finalidade de observar qual a melhor condição de análise para avaliar a estabilidade das colunas cromatográficas. Kirkland e colaboradores (KIRKLAND; VAN STRATEN; CLAESSENS, 1995; KIRKLAND *et al.*, 1997) definiram a influência dessas variáveis na estabilidade da fase estacionária. Os seus estudos mostraram que colunas a base de sílica, apresentam diferente solubilidade que depende do tampão utilizado, e que tampões carbonato e fosfato são mais drásticos do que tampões boratos e glicerina. Já no caso do contra íon do tampão, a solubilidade da fase estacionária diminui na seguinte ordem $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. Em alguns testes com o lítio, os resultados obtidos indicaram que os tampões de lítio podem reduzir a dissolução da sílica da fase estacionária em pH elevados.

A composição da fase móvel é muito relevante em análises cromatográficas. Kirkland, em seus testes de estabilidade, observou que a solubilidade da sílica é maior quando usada em

fases móveis tamponadas em metanol se comparadas com as preparadas com acetonitrila, já as fases monoméricas estericamente protegidas, um tipo de fase estacionária quimicamente ligada, apresentam a mesma solubilidade em ambos os solventes (KIRKLAND *et al.*, 1997). A estabilidade das fases estacionárias reduz drasticamente em concentrações de tampões superiores a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e a temperaturas mais elevadas, isso faz com que o tempo de vida útil da coluna seja menor.

O CroMat da UFU, desde o início de suas atividades em 2009, vêm desenvolvendo FE imobilizadas com polímeros no intuito de se obter materiais alternativos, econômicos e seletivos às FE quimicamente ligadas. Diversos polímeros têm sido estudados e os resultados cromatográficos indicam a possibilidade de análise de substâncias até então difíceis de serem separadas por CLAE-FR, como substâncias de maior polaridade e de maiores estruturas moleculares (DIB; FARIA, 2014; CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016; AMPARO; MARQUES; FARIA, 2013).

Apesar das aplicações bem-sucedidas das FE produzidas pelo CroMat e da eficiência de separação para os compostos alcançada em condições degradantes para as FE comerciais, o tempo de vida útil dessas fases ainda não é conhecido. Desta forma, buscou-se neste trabalho desenvolver um método que permita avaliar a estabilidade química das fases estacionárias produzidas no laboratório de forma mais rápida, exigindo menos tempo de equipamento e quantidades menores de reagentes e solventes. O limite inferior da durabilidade das fases estacionárias poderá ser previsto a partir da comparação da estabilidade das FE imobilizadas com polímeros preparadas no laboratório com fases C_{18} quimicamente ligadas comerciais submetidas sob as mesmas condições de degradação.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um método de avaliação rápida da estabilidade e do tempo de vida útil de fases estacionárias para CLAE-FR preparadas a partir da imobilização de diferentes polímeros sobre partículas de óxido inorgânico. Para a proposição do método será empregado como material de teste uma fase estacionária comercial, produzida sob mesmo lote, para evitar variações independentes das condições que afetam a degradação da coluna cromatográfica.

Para cumprir com o objetivo, diferentes condições cromatográficas de análise foram avaliadas quanto a durabilidade de um lote de uma fase estacionária C₁₈ comercial a partir da análise periódica de uma mistura teste de compostos. A estabilidade da FE foi avaliada quanto ao efeito do tipo de tampão empregado, a concentração do tampão, temperatura da coluna e composição da fase móvel.

Uma vez definido o método de avaliação rápida da vida útil das fases estacionárias, foi avaliada as FE preparadas no CroMat baseadas nos polímeros: poli(dimetilsiloxano-*co*-óxido de etileno) (PEO), poli(dimetil-*co*-alquilmetilsiloxano) (PDAS), poli(glicidoxipropilmetilsiloxano) (PGPMS) imobilizados termicamente sob sílica ou sílica aluminizada. As estabilidades das FE preparadas no CroMat foram comparadas à estabilidade de fases C₁₈ quimicamente ligadas comerciais, avaliadas pelo mesmo método desenvolvido.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais, reagentes, vidrarias e equipamentos

Para o preparo das fases estacionárias que foram avaliadas no desenvolvimento do método de degradação foi utilizada uma fase comercial Kromasil C₁₈ quimicamente ligada, lote 2219, diâmetro de partículas de 5 µm diâmetro de poro 100 Å; béqueres de 10 mL; pipetas de Pasteur; espátulas; provetas de 25 mL; tubos de ensaio com tampa rosqueável de 20 mL; funis de vidro, e; balança eletrônica semi-analítica com precisão de 0,0001 g.

Para o preparo da fase móvel, foram utilizados membranas de Nylon[®] (Millipore[®], Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 µm e diâmetro de 45 mm; sistema de filtração de fase móvel; funil de placa sinterizada; bomba de vácuo; kitassato de 500 mL, e; banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil). O reagente utilizado para o preparo da fase móvel foi o metanol, grau cromatográfico com 99,5 % (Dinâmica Química, Indaiatuba, Brasil), para a purificação da água fez-se uso de um ultrapurificador de água (MegaPurity[®], Billerica, EUA).

Para análise das misturas de compostos pelas fases estacionárias preparadas nesse trabalho foram realizadas medidas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters modelo Alliance e2695, com sistema de detecção de arranjo de diodos modelo 2998 PDA, gerenciado pelo software Empower3[®]. Para a avaliação das fases, os parâmetros cromatográficos foram medidos a partir da separação de uma mistura teste padrão composta por uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno.

Para o preparo da suspensão e enchimento da fase LiChrospher 60 RP-select B (5µm) [C₁₈] foram empregados os solventes clorofórmio e metanol. Para a caracterização das fases os seguintes compostos padrões obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) foram utilizados: uracila 99 %, benzonitrila 99 %, benzeno 99,9 %, tolueno 99,8 % e naftaleno 99 % (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Preparação das fases estacionárias para avaliação da estabilidade

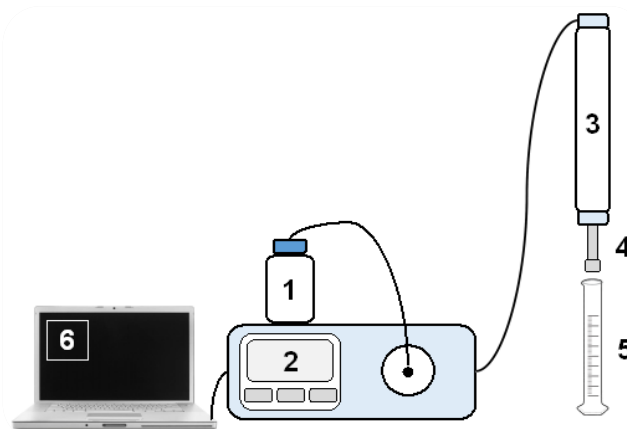
As fases estacionárias imobilizadas por polímeros estudadas neste trabalho foram produzidas pelo grupo CroMat ao longo dos últimos 10 anos. Para a preparação de cada fase foram seguidos os procedimentos otimizados pelos autores em cada um de seus trabalhos de conclusão de curso e/ou dissertações. Para o preparo da fase poli(glicidoxipropilmetilsiloxano) (PGPMS) foi seguido o roteiro apresentado no trabalho de GAMA (2017). Já para o preparo da

fase poli(dimetilsiloxano-co-óxido de etileno) PEO, foi seguido o trabalho de CARVALHO (2017). A preparação da fase imobilizada termicamente do polímero PEO sob a sílica aluminizada foi realizada segundo SANTOS (2016). Outra FE estudada quanto a sua estabilidade foi a imobilizada pelo polímero poli(dimetil-co-alquilmetilsiloxano) (PDAS) sobre o suporte de sílica ou de sílica aluminizada, na qual para sua preparação seguiu-se o trabalho de SOUZA (2016).

3.2.1 Enchimento das colunas cromatográficas com as fases estacionárias

Para o enchimento de colunas cromatográficas com as fases Si(PGPMS), SiAl(PEO), Si(PEO), Si(PDAS), SiAl(PDAS) e SiC₁₈, foram preparadas suspensões das fases em clorofórmio. A suspensão consistiu em aproximadamente 1,0 g de FE em 20 mL de clorofórmio filtrado. As suspensões foram agitadas em vórtex. Após esse período, as suspensões foram transferidas para o sistema de enchimento de colunas, apresentado na Figura 3.

Figura 3. Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica com as fases estacionárias.



Fonte: Própria autora.

O sistema de enchimento consiste em um reservatório do solvente propulsor (1), que é preenchido com metanol previamente filtrado. Em seguida, a pressão da bomba (2) foi ajustada para um valor máximo de 9.000 psi, para um melhor empacotamento das partículas, reservatório de suspensão (3), que contém uma coluna cromatográfica aço inox com 50 milímetros de comprimento e 4 mm de diâmetro interno (4), devidamente acoplada à sua extremidade. O volume do reservatório foi preenchido com 3 mL de metanol, em seguida, colocou-se a suspensões e por último completou-se o reservatório com o clorofórmio. Fechou-se a extremidade superior do reservatório de suspensão pelo qual foi adicionada a FE. Com o sistema

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

3.2.2 Condicionamento das colunas cromatográficas

Após o enchimento da coluna cromatográfica, a coluna foi conectada ao cromatógrafo a líquido para o condicionamento da coluna, no qual utilizou-se como fase móvel MeOH:H₂O (50:50, v/v) por 1 h. Nessa etapa apenas uma das extremidades das colunas foi acoplada no cromatógrafo a líquido, neste caso, na conexão das bombas cromatográficas, enquanto a outra extremidade foi ligada diretamente ao descarte. Esse procedimento foi de grande importância, uma vez que resíduos das etapas anteriores poderiam ser eluídos junto à fase móvel, ocorrendo assim o entupimento da cela de detecção do detector de arranjo de diodos.

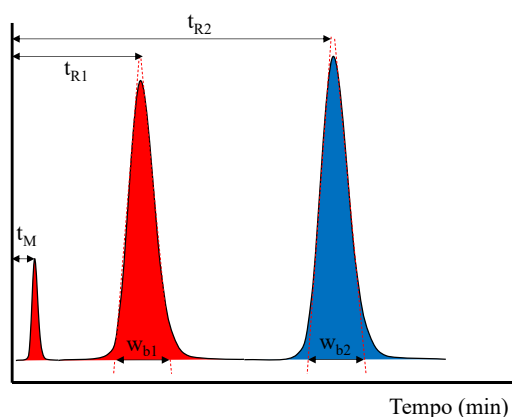
3.3 Preparação da fase móvel

Os solventes constituintes da fase móvel (água, metanol e soluções tampão: Na₂CO₃, CH₃COONH₄ e Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, as quais foram preparadas sob diferentes concentrações: 0,050 mol L⁻¹, 0,025 mol L⁻¹ e 0,001 mol L⁻¹ em diferentes pH: 9, 10 e 11), esses foram medidos e filtrados, individualmente, utilizando-se de um sistema de filtração de fase móvel e uma membrana de Nylon® de 45 mm de diâmetro e 0,22 μm de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados em frascos individuais e deixados por 20 minutos em banho ultrassom, para serem desgaseificados. Após desgaseificados, os solventes foram dispostos nos reservatórios para fase móvel do sistema cromatográfico.

3.4 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias

Na avaliação das fases estacionárias foram analisados parâmetros cromatográficos de uma mistura teste constituída de 5 compostos: benzeno, benzonitrila, naftaleno, tolueno e uracila. A ordem de eluição desses compostos é um indicativo da modalidade da fase estacionária. Os compostos presentes nesta mistura foram detectados no comprimento de onda de 254 nm e o volume de amostra injetado foi 10 µL. Os parâmetros cromatográficos avaliados durante o estudo de estabilidade foram o fator de retenção (k), a eficiência de coluna (N), através da medida de número de pratos, e a resolução (R_s). Os parâmetros avaliados no teste de estabilidade são indicados em um cromatograma ilustrativo na Figura 4.

Figura 4. Cromatograma de separação de misturas por cromatografia líquida de alta eficiência e as informações de medidas dos picos.



Fonte: Própria autora

As Equações 1 a 3 apresentam, respectivamente, as fórmulas de obtenção dos parâmetros fator de retenção (k), número de pratos (N) e resolução (R_s), avaliados nesse estudo.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Equação 2}$$

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad \text{Equação 3}$$

Em que: k = fator de retenção; N = número de pratos; R_s = resolução; 16 e 2 são constantes de proporcionalidade para o cálculo do número de pratos e resolução, respectivamente; t_R é o tempo de retenção do soluto; t_M é o tempo de retenção para um composto não retido; W_b é a largura do

pico na linha de base; os subíndices 1 e 2 correspondem a ordem de eluição dos compostos no cromatograma.

Para o cálculo do volume de coluna (V_{col}) foi utilizado a Equação 4, considerando uma coluna de 50×4 mm d.i e uma vazão de fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$.

$$V_{col} = \pi r^2 L \quad \text{Equação 4}$$

Onde: r é o raio da coluna (2 mm) e L é o comprimento da coluna (50 mm)

3.5 Desenvolvimento do método de degradação rápida de fases estacionárias

Algumas condições experimentais de análise podem afetar a vida útil das partículas das fases estacionárias, tais como: pH da fase móvel, temperatura da coluna, concentração e tipo de tampão empregado e composição dos solventes da fase móvel. Estas condições foram estudadas para desenvolver um método de degradação das fases estacionárias que seja rápido o suficiente para não levar a um alto consumo de solventes orgânicos e, conseqüentemente, geração de resíduos tóxicos, porém, que seja capaz de diferenciar os materiais de separação quanto às suas vidas úteis enquanto colunas cromatográficas. Este estudo foi realizado com uma fase estacionária comercial Kromasil C₁₈, lote de preparação 2219. As diferentes condições de análise avaliadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis e seus níveis estudados no desenvolvimento de um método de degradação rápida de fases estacionárias para CLAE-FR.

Variáveis estudadas	Níveis das variáveis		
pH	9,00	10,00	11,00
Tampão	Carbonato	Fosfato	Acetato de Amônio
Temperatura (°C)	40	45	50
Concentração do tampão (mol L⁻¹)	0,001	0,025	0,050
% solvente orgânico (%)	40	50	60

As condições apresentadas na Tabela 1 foram avaliadas univariadamente e fixadas de acordo com a resistência da fase estacionária em cada etapa. A resposta empregada para avaliar a estabilidade das fases estacionárias foi a eficiência de coluna (número de pratos) para o pico do naftaleno na mistura teste padrão. Para definição do método de degradação rápida das fases estacionárias imobilizadas por polímeros, utilizaram-se as condições degradantes fixadas durante o estudo univariado realizado nesta etapa para a fase Kromasil C₁₈.

3.6 Caracterização físico-química da fase estacionária C₁₈

Porções da fase estacionária C₁₈ foram caracterizadas antes e após a aplicação do método de degradação otimizado neste trabalho para avaliação do efeito das condições degradantes definidas. Avaliações morfológicas e do teor de fase ligada das partículas da fase estacionária foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), área superficial específica e porosidade (ASAP) e análise termogravimétrica (TGA).

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação morfológica das partículas da C₁₈ foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após a degradação da fase estacionária pelo método desenvolvido neste trabalho. Para tal, as partículas da fase estacionária foram fixadas em porta-amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas como uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s para formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As imagens das partículas de C₁₈ foram obtidas com diferentes ampliações. Essas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuário do IQ/UFU, empregando um microscópio eletrônico TESCAN modelo Vega3 (Tóquio, Japão) a 20 kV.

3.6.2 Análise de área superficial específica e porosidade

Porções de C₁₈ antes e após o teste de degradação foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros (ASAP). Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. Antes das medidas, as amostras foram desgaseificadas a 150 °C por 4 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (GREGG; SING, 1982), a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 5.

$$d_p = \frac{4V_p}{S_{BET}} \quad \text{Equação 5}$$

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

Para estas medidas foi empregado um analisador de poros e área superficial específica ASAP modelo 2020 plus da Micromeritics (Norcross, GA, EUA) no Laboratório Multiusuário da UFU.

3.6.3 Análise termogravimétrica

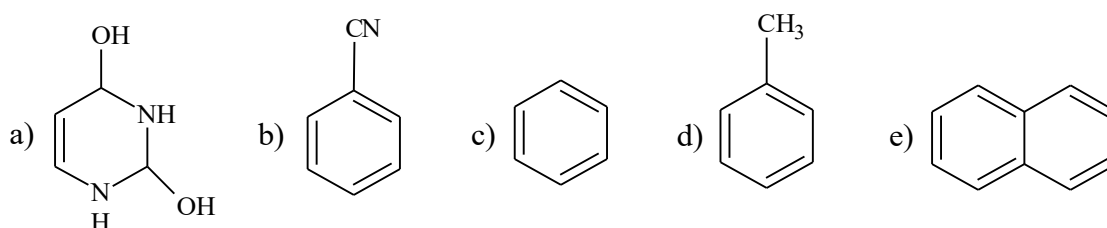
A porcentagem de modificador orgânico da FE C₁₈ foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA, *thermogravimetric analysis*) antes e após a aplicação do método de degradação, na qual cerca de 5 mg de amostra foram colocados em uma microbalança no analisador térmico e submetidos a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas sob atmosfera de N₂ em um analisador termogravimétrico da TA Instruments modelo TGA 55 (New Castle, DE, EUA), no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP) da UFU, relacionando a perda da massa da fase estacionária com o aumento da temperatura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação preliminar da fase estacionária C₁₈

Inicialmente foi realizado o estudo da melhor condição de FM para a separação de uma mistura teste padrão contendo compostos hidrofóbicos, normalmente empregados para a caracterização de fases reversas. A mistura foi constituída por uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 5.

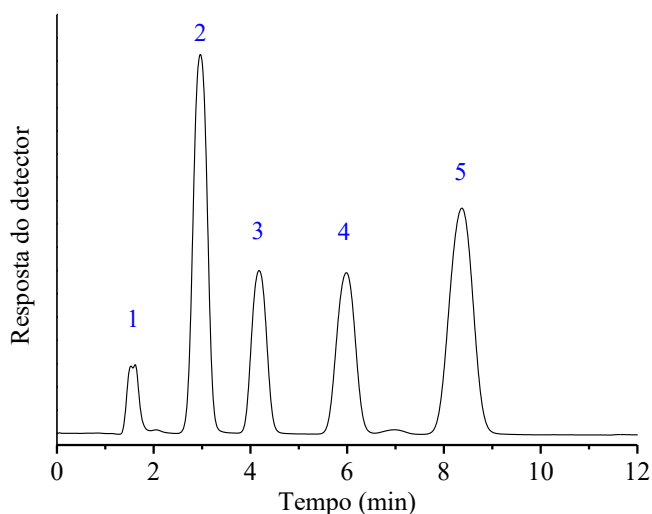
Figura 5. Estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste empregada na avaliação da estabilidade das fases estacionárias. a) Uracila, b) benzonitrila, c) benzeno, d) tolueno e e) naftaleno.



Fonte: Própria autora.

Após o enchimento da coluna com a fase Kromasil C₁₈ a mistura teste foi submetida à separação e o cromatograma obtido é apresentado na Figura 6. A separação cromatográfica foi realizada em condição de FM de MeOH:H₂O (60:40, v/v) com vazão de 0,4 mL min⁻¹ e detecção a 254 nm.

Figura 6. Cromatograma da separação dos compostos da mistura teste. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH: H₂O (60:40, v/v) com vazão de 0,4 mL min⁻¹ e detecção a 254 nm.



A separação da mistura teste através da fase estacionária C₁₈ se mostrou eficiente nas condições previamente citadas. Como esperado a ordem de eluição dos compostos foi governada pela modalidade de fase reversa. A uracila é empregada na mistura por se tratar de um composto que não apresenta interação com a fase estacionária reversa e, portanto, será eluída juntamente com a fase móvel, registrando, portanto, o tempo de retenção de um composto não retido (t_M). A benzonitrila é o composto mais polar da mistura e, por este motivo, é o composto que é retido mais fracamente pela fase C₁₈. O benzeno e o tolueno são adicionados à mistura para avaliação da capacidade de diferenciação de um grupo CH₃ entre moléculas retidas pela fase C₁₈. Quanto maior a distância entre os picos no cromatograma, maior é a capacidade de separação de moléculas com esta diferença - também denominada de seletividade metilênica (α_{CH_3}). O naftaleno é o composto mais apolar da mistura e, portanto, o último a ser eluído da fase estacionária. Por apresentar maior retenção e permanecer por maior tempo na coluna, os parâmetros cromatográficos de retenção e desempenho do naftaleno foram utilizados para avaliar a estabilidade das fases estacionárias com a passagem contínua de fase móvel em condições de destruição do leito cromatográfico.

4.2 Desenvolvimento do método de degradação rápida das fases estacionárias

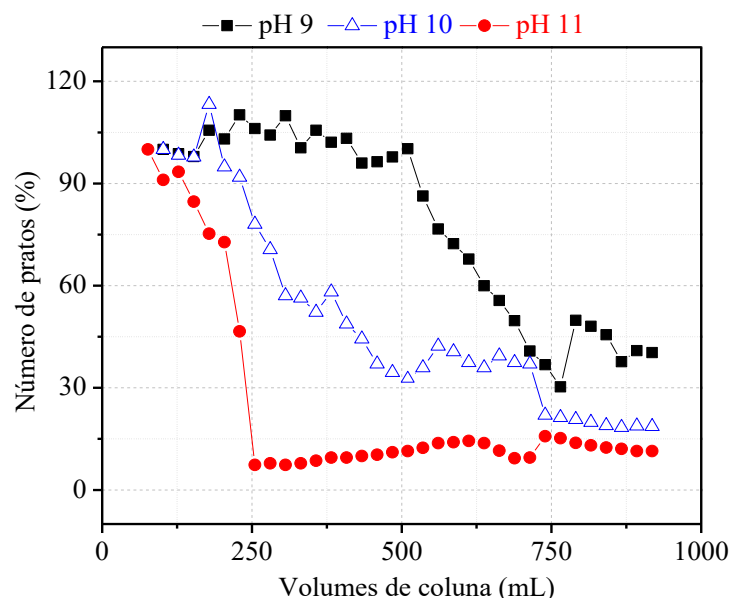
Para o desenvolvimento do método de degradação rápida, diferentes condições de análise foram avaliadas de forma univariada e definidas de acordo com a durabilidade da fase

estacionária durante o teste. A escolha das condições foi sempre baseada em uma duração do teste que fosse rápida o suficiente para evitar o consumo demasiado de solventes e o tempo prolongado de uso do equipamento, mas também não tão rápida que não fosse possibilitasse diferenciar materiais com estabilidades diferentes. As condições estudadas para a definição do método foram: o pH do componente aquoso da fase móvel; a temperatura da coluna; o tipo de solução tampão; a concentração do tampão, e; a proporção dos solventes da fase móvel.

4.2.1 Efeito do pH na vida útil das fases estacionárias

A avaliação da estabilidade das fases estacionárias foi realizada inicialmente com uma coluna cromatográfica C₁₈ comercial em três condições diferentes de pH da fase móvel: pH 9,00; 10,00 e 11,00. Os valores pH do componente aquoso da fase móvel foram ajustados com a preparação de soluções tampão fosfato a 0,050 mol L⁻¹. Todas as três condições de pH promovem a dissolução da sílica. As condições de análise do teste foram: fase móvel MeOH:solução tampão fosfato a 0,050 mol L⁻¹ 60:40 (v/v), e vazão de 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 50 °C, injeção de 10 µL e detecção UV a 254 nm. A coluna contendo a fase estacionária C₁₈ foi conectada ao sistema cromatográfico, e o tempo total de análise foi previamente definido em 24 h, com avaliações contínuas do desempenho da fase estacionária a partir de injeções da mistura teste a cada 30 min. O tempo de vida útil da coluna foi determinado em termos de número de pratos (N) para o pico do naftaleno em função do volume de coluna eluído da fase móvel sob teste. Os resultados obtidos para esta avaliação estão apresentados graficamente na Figura 7.

Figura 7. Efeito do pH da fase móvel na estabilidade da fase estacionária C_{18} comercial em termos de números de pratos para o pico do naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH: solução fosfatoa $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v) com vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 50°C e detecção UV a 254 nm .



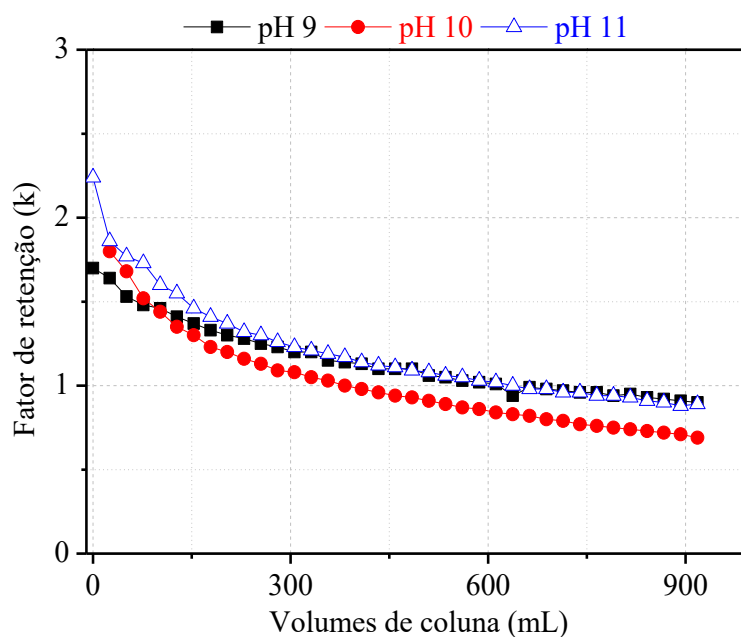
De acordo com a Figura 7, observa-se que com o aumento do pH há uma diminuição do tempo de vida útil da coluna devido à aceleração da degradação da sílica, convertendo-a a silicato que é solúvel em água. Com a maior disponibilidade de grupos HO^- na fase móvel ocorre uma conversão mais rápida de SiO_2 à SiO_3^- . O estudo realizado em pH 9,00 mostrou que é necessário um maior volume cerca de 690 mL de fase móvel para que haja a destruição do leito cromatográfico, medido pela perda de 50 % do número de pratos (eficiência) inicial da fase estacionária, sendo necessário um tempo de 29 horas para que ocorra a degradação da FE. Enquanto em pH 11,00 a degradação da fase é muito rápida, ocorrendo em um volume de coluna de aproximadamente 250 mL, utilizando-se um tempo de 10 horas para degradação da FE. Essa rápida solubilização da FE em pH 11 pode dificultar a comparação entre materiais que tenham estabilidades químicas próximas. Em fases C_{18} quimicamente ligadas, o suporte de sílica não é totalmente protegido pelas moléculas do grupamento organossilano devido ao impedimento estérico causado pela inserção de moléculas do C_{18} , altamente volumosas, a grupos silanóis (Si-OH) vizinhos na superfície e poros da sílica (KIRKLAND, 2004). Assim, parte do suporte fica exposto ao contato com a fase móvel que, sob condições alcalinas, leva à destruição do leito cromatográfico. O pH da fase móvel é a condição experimental mais agressiva para a fase estacionária. Assim, para a avaliação do efeito de outras condições de análise na durabilidade da coluna cromatográfica recheada com C_{18} , a fase móvel foi ajustada para pH 10,00, por fornecer uma análise rápida o suficiente para avaliar pequenas diferenças na vida útil da fase estacionária,

isso porque para a degradação da coluna é utilizado um volume de aproximadamente 380 mL, onde a degradação da FE ocorre após 16 horas de passagem de FM alcalina..

A fim de verificar a variação da retenção do naftaleno na fase estacionária ao longo do estudo de estabilidade em diferentes valores de pH, foi medido também o fator de retenção para o pico do naftaleno. O fator de retenção (k) diz respeito a retenção de um soluto na fase estacionária, determinado pela razão entre o tempo que as moléculas ficam retidas na fase estacionária e o tempo que percorrem a coluna contidas no solvente da fase móvel.

A Figura 8 apresenta os perfis de estabilidade para os parâmetros de fator de retenção na coluna contendo fase C_{18} comercial ao longo do estudo de estabilidade em diferentes condições de pH da fase móvel.

Figura 8. Fator de retenção obtido na degradação da fase estacionaria C_{18} variando o pH da fase móvel. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 50°C e detecção UV a 254 nm .

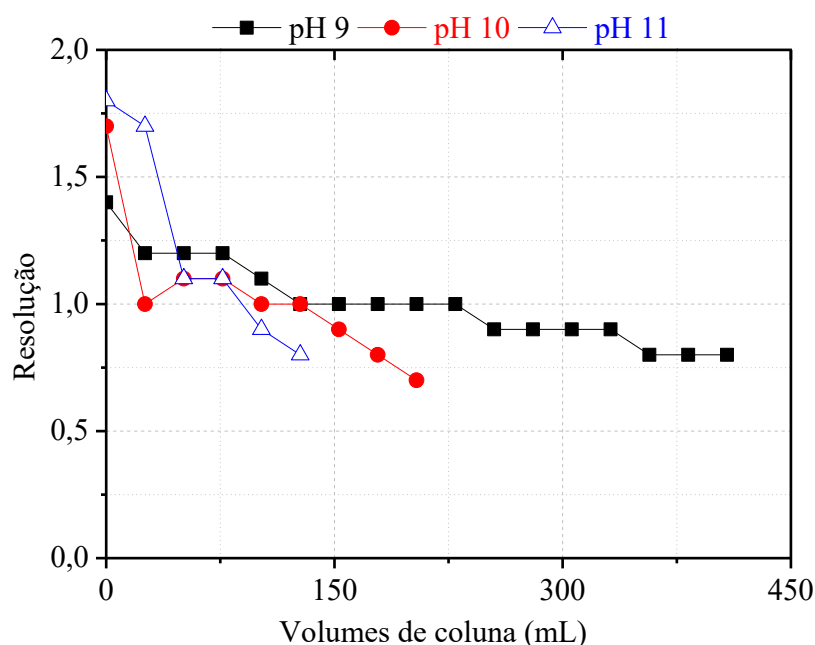


Para esse estudo o pico do naftaleno foi utilizado para monitorar a variação da retenção dos compostos na fase estacionária durante o teste de estabilidade empregando diferentes condições de pH da fase móvel. De acordo com a Figura 8, pode-se observar que o fator de retenção para o pico do naftaleno decai continuamente ao longo do estudo de estabilidade, independentemente do valor de pH da fase móvel. Este fato indica que há uma perda contínua da retentividade de compostos na fase estacionária devido à sua perda contínua de C_{18} causada pela dissolução da sílica. Este parâmetro, no entanto, não possibilita definir o momento em que a

coluna perde sua capacidade de separação, uma vez que a perda contínua não apresenta em nenhum momento uma queda brusca como ocorre no monitoramento da eficiência de coluna.

A resolução (R_s) é o grau de separação entre dois picos adjacentes no cromatograma. Este parâmetro foi monitorado para avaliar a capacidade de separação dos picos do naftaleno e do tolueno no cromatograma com a passagem contínua de fase móvel em condições de degradação. A Figura 9 indica os valores de resolução para o pico do tolueno e naftaleno.

Figura 9. Variação da resolução da fase estacionária C_{18} para os picos do naftaleno e tolueno na mistura teste em diferentes condições de pH da fase móvel. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 50°C e detecção UV a 254 nm .



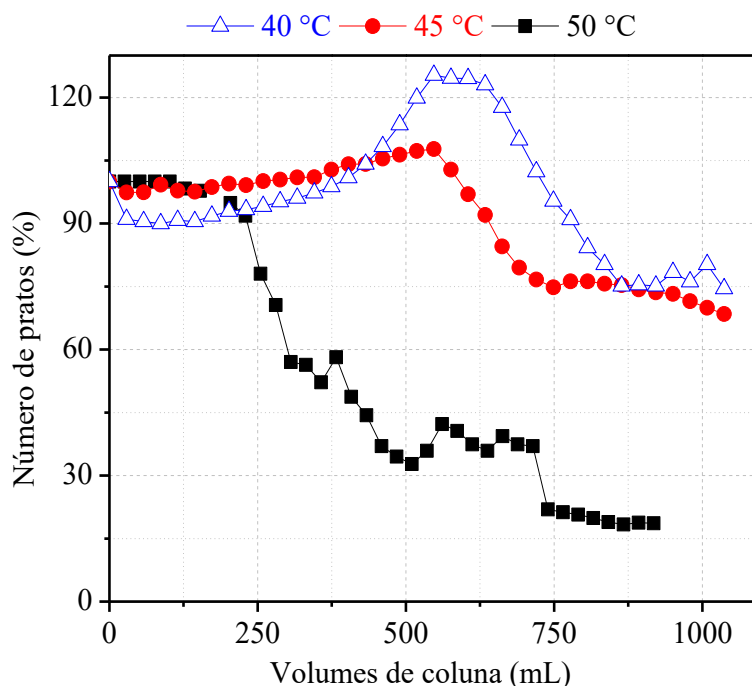
De acordo com a Figura 9, pode-se observar que a fase estacionária C_{18} , submetida a condições alcalinas de fase móvel, perde a capacidade de separar o tolueno e o naftaleno mais rapidamente quanto maior for o pH da fase móvel. Em pH 9,00, foi possível medir a separação entre os dois compostos até a passagem de 450 volumes de coluna de fase móvel, já em pH 10,00 a separação ocorreu até cerca de 175 volumes de coluna e, em pH 11,00, a separação não ultrapassou 150 volumes de coluna. Isto significa que com a degradação da sílica, conversão a silicato, a perda de moléculas de C_{18} quimicamente ligadas é contínua, fazendo com que a capacidade de separação seja rapidamente perdida pela fase estacionária. Quando os picos começaram a coeluir a medida da resolução foi interrompida, registrando os valores máximos de volumes de coluna informados anteriormente.

4.2.2 Efeito da temperatura de coluna

No estudo do efeito da temperatura da coluna na estabilidade de fases estacionárias o mesmo lote da fase C₁₈ foi submetido ao processo de enchimento da mesma coluna de aço inox e a coluna avaliada sob condições degradantes de fase móvel com MeOH:solução tampão fosfato a 0,050 mol L⁻¹ a pH 10,00 60:40 (v/v) e vazão de 0,4 mL min⁻¹. Foram avaliadas três diferentes condições de temperatura do forno da coluna: 40, 45 e 50 °C. O objetivo de variar a temperatura do forno da coluna durante o teste de estabilidade é conhecer o seu efeito no processo de degradação da fase estacionária nas análises cromatográficas por CLAE-FR, visto que em algumas análises se faz necessário o uso de temperatura superior à temperatura ambiente. A temperatura influencia diretamente a viscosidade dos solventes da fase móvel, reduzindo a viscosidade com o aumento da temperatura, podendo inclusive melhorar o grau de separação dos solutos devido ao aumento da eficiência do processo cromatográfico. Isso acontece devido ao aumento da velocidade de transferência da massa dos solutos entre a FE e a FM. No entanto, o aumento de temperatura pode acelerar a degradação da fase estacionária a base de sílica, devido ao acesso de porções de fase móvel em microestruturas porosas do suporte com a redução da viscosidade dos solventes. Fases estacionárias C₁₈ convencionais têm uso recomendado normalmente até 60 °C, apesar da existência de outros materiais resistentes a temperaturas > 150 °C como aqueles baseados em suportes de zircônia. No entanto, nas fases baseadas em sílica, o efeito de hidrólise das ligações entre o C₁₈ e a sílica é aumentado com o aumento da temperatura (VANHOENACKER; SANDRA, 2008; TEUTENBERG *et al.*, 2009).

A coluna de aço inox recheada com a fase estacionária C₁₈ foi conectada ao sistema cromatográfico, ajustando a temperatura para 50 °C e o tempo de estudo para 24 h e, posteriormente, outras colunas recheadas com novas porções do mesmo lote da fase C₁₈ foram avaliadas em temperaturas de 40 °C e 45 °C. O tempo de vida útil da coluna foi determinado em termos de número de pratos (N) para o pico do naftaleno em função dos volumes de coluna eluídos da fase móvel sob as condições teste. Os resultados obtidos para esta avaliação estão apresentados graficamente na Figura 10.

Figura 10. Variação do número de pratos do pico do naftaleno em uma coluna C_{18} avaliada em diferentes condições de temperaturas de coluna. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção UV a 254 nm.



A Figura 10 mostra que quando a coluna C_{18} é submetida a uma temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a degradação ocorre de forma mais rápida, isso é devido a diminuição da viscosidade da fase móvel possibilitando o acesso a estrutura microporosa da sílica e provocando a solubilidade da sílica de forma mais rápida através dos microporos e poros capilarizados da FE. Além disso, o aumento da temperatura leva a um favorecimento da reação de hidrólise entre as moléculas C_{18} e a superfície da sílica (TEUTENBERG, 2009). Como pode ser visto, o aumento da temperatura parece ter um efeito exponencial na redução da vida útil da coluna, de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, a degradação ocorre de forma mais acelerada se comparada com a perda de eficiência observada no aumento de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dessa forma, o ganho na separação cromatográfica com o uso de temperatura de coluna de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ não parece compensar a redução, quase que pela metade da vida útil da coluna, se a temperatura fosse mantida a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Outra observação a ser feita é a elevação da eficiência de coluna (número de pratos) nas temperaturas de 40 e $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo da avaliação. Esse aumento se deve, provavelmente, ao contínuo acesso da fase móvel a microporos da fase estacionária, encontrando novos sítios ativos de interação soluto-fase estacionária associada ao aumento da taxa de transferência de massa do soluto na fase móvel. Para avaliação do efeito de outras variáveis na estabilidade da fase C_{18} comercial, a temperatura da coluna foi fixada em $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, devido à morte da coluna ocorrer de forma gradativa, fazendo com que as

propriedades da fase estacionária possam ser mais bem avaliadas sob esta temperatura que em temperaturas mais elevadas.

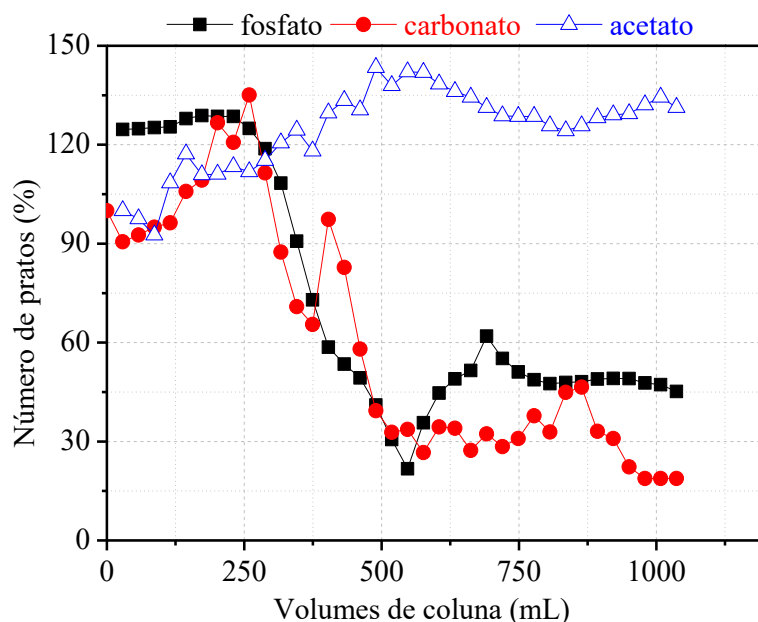
4.2.3 Efeito do uso de soluções tampão

As soluções tampão desempenham um papel importante como componente aquoso das fases móveis para CLAE-FR na separação cromatográfica, pois estas evitam as variações do pH da fase móvel, seja pela solubilização de CO₂ atmosférico ou pela evaporação de aditivos e, consequentemente, impedem a variação da retenção e a perda da seletividade dos analitos, em especial aqueles ionizáveis (ESPINOSA; BOSCH; ROSÉS, 2002).

A capacidade de tamponar de uma solução é determinada pelo valor do pH e sua proximidade ao valor de pKa e pela concentração dos componentes (ácido fraco e base conjugada) do tampão. Uma solução tampão diluída possui menor capacidade de tamponamento que uma solução concentrada, não resistindo a alteração do pH com a adição de pequenas quantidades de ácido ou base fortes à esta solução. Sob altas concentrações, os tampões apresentam maior capacidade de tamponamento. Porém, sob estas condições, a mistura com o solvente orgânico na fase móvel pode levar a precipitação de partículas de sais e, assim, ocasionar o entupimento de tubulações e da cela de detecção, além da destruição do leito cromatográfico das colunas (CLAESSENS; VAN STRATEN; KIRKLAND, 1996).

O estudo do efeito de soluções tampão (tipo, concentração e porcentagem na composição da fase móvel) na vida útil da fase estacionária C₁₈ foi inicialmente realizado quanto ao tipo de componente da solução tampão. Foram avaliados dois tipos de tampões inorgânicos: o fosfato e o carbonato, e um tampão orgânico: o acetato de amônio, utilizando as condições de fase móvel com MeOH:solução a 0,050 mol L⁻¹ e pH 10,00 a 60:40 (v/v), vazão de 0,4 mL min⁻¹ e temperatura de 45 °C. O resultado obtido no estudo do efeito do tipo de tampão está apresentado na Figura 11.

Figura 11. Variação do número de pratos do pico do naftaleno da mistura teste padrão na fase estacionária C_{18} em função do tipo de tampão empregado na fase móvel. Condições utilizadas: MeOH:0,050 mol L^{-1} de tampão, pH 10 (60:40 v/v), vazão 0,4 mL min^{-1} , temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm.

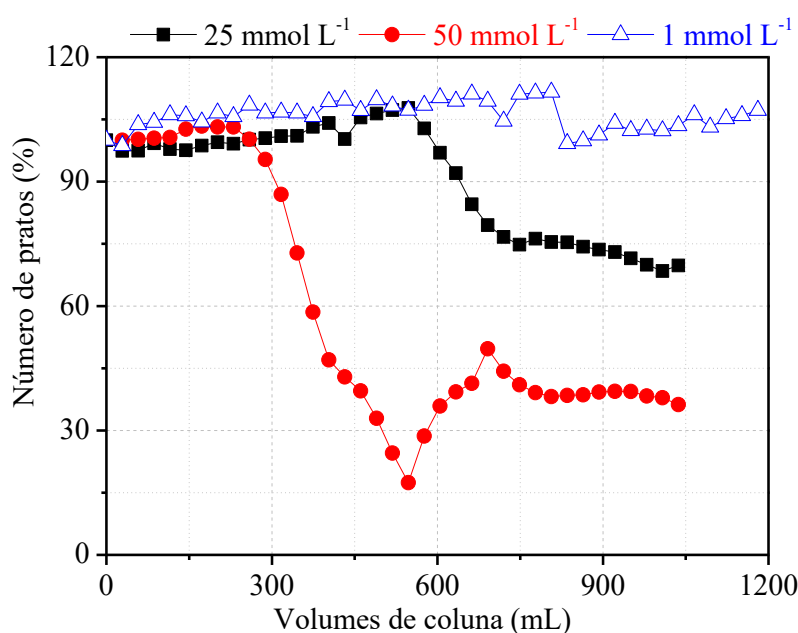


A Figura 11 mostra o efeito de diferentes tipos de tampão da fase móvel na estabilidade da fase estacionária C_{18} , sendo observado de uma forma geral que soluções aquosas de fosfato e carbonato apresentam a mesma taxa de redução da vida útil das fases estacionárias C_{18} , sendo essa taxa de degradação maior que a apresentada pelo uso de um tampão orgânico, acetato de amônio. Dentro do período investigado, a fase móvel tamponada com acetato de amônio não foi capaz de provocar a morte da coluna cromatográfica, por não apresentar uma queda de 50 % do número de pratos, sendo necessário um volume de coluna de 1000 mL e um tempo de 41,7 horas para que a fase seja degradada. No entanto, é possível observar que a fase móvel contendo tampões inorgânicos apresentou um efeito degradante maior na fase estacionária, isso porque elas utilizaram um volume de 480 mL e um tempo de 20 horas para que ocorresse a solubilização do leito cromatográfico. Dentre as soluções inorgânicas, o tampão carbonato apresentou uma maior variação do número de pratos para o pico do naftaleno, o que significa um ataque mais agressivo ao leito cromatográfico em comparação a fase móvel preparada com a solução fosfato. Isso pode ter ocorrido devido aos rearranjos das partículas da fase estacionária que ocorrem devido a dissolução parcial do leito no interior da coluna, provocando oscilações da eficiência de coluna quando da passagem da fase móvel. Essa variação pode estar associada ao restabelecimento, portanto, da capacidade de separação da fase C_{18} . É importante ressaltar que em pH 10,00 a fase móvel está tamponada com as soluções tampão carbonato ($pK_a = 10,4$) e tampão amônio ($pK_a =$

9,3), indicando que a variação de pH da fase móvel em ambas as condições são mínimas, apesar do tampão carbonato se apresentar mais degradante. Diante desses resultados, para o método de avaliação da estabilidade das fases estacionárias foi fixada a solução fosfato como componente aquoso da fase móvel.

Segundo Kirkland e colaboradores, concentrações de tampões inorgânicos maiores que $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ são eficientes no tamponamento da fase móvel, porém podem elevar o grau de solubilidade da fase estacionária na FM ou deteriorá-la devido à precipitação do sal na porção orgânica da fase móvel, levando até ao bloqueio do fluxo de fase móvel (CLAESSENS; VAN STRATEN; KIRKLAND, 1996). Para o estudo do efeito da concentração do tampão da fase móvel na estabilidade química de fases estacionárias para cromatografia líquida foi utilizada uma solução fosfato a pH 10,00 em diferentes concentrações, 0,050, 0,025 e 0,001 mol L^{-1} . As condições de avaliação da estabilidade da fase C_{18} , sob o mesmo lote testado anteriormente, foram: fase móvel MeOH:solução fosfato a pH 10,00 60:40 (v/v), e vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ com temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm. Definidas as condições de análises, a coluna de aço inox recheada com porções do mesmo lote da fase estacionária C_{18} foi conectada ao sistema cromatográfico, e submetida ao teste de estabilidade. Os resultados obtidos para esta avaliação estão apresentados graficamente na Figura 12.

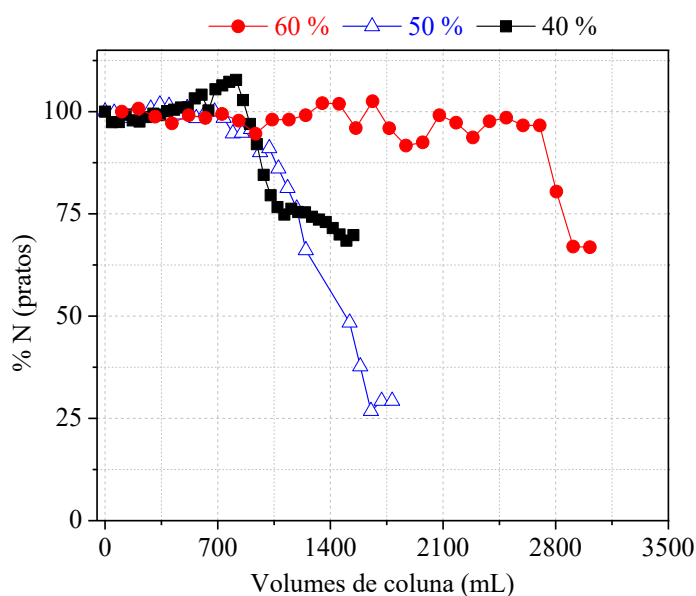
Figura 12. Efeito da concentração da fase móvel na estabilidade da fase estacionária C_{18} comercial em termos de números de pratos para o pico do naftaleno da mistura teste padrão. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm.



Ao analisar a Figura 12, pode-se observar que as concentrações baixas como $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de solução fosfato na FM, não foram capazes de destruir o leito cromatográfico, mesmo empregando condições alcalinas e temperaturas elevadas no estudo. No entanto, a vida útil da fase C_{18} é reduzida progressivamente com o aumento da concentração do sal. Se por um lado às altas concentrações dos sais do tampão garantem uma maior capacidade tamponante da fase móvel e uma menor variação de retenção dos compostos, sobretudo os ionizáveis na fase estacionária, por outro lado, observa-se que concentrações elevadas do tampão aumentam a taxa de degradação da fase C_{18} , além de incorrer o risco de entupimento das tubulações do sistema cromatográfico devido a precipitação do sal. Esses resultados indicam que a concentração da solução fosfato apresenta um papel preponderante na degradação da fase estacionária, tanto quanto o pH da fase móvel.

Outro fator estudado para avaliar a resistência da fase C_{18} quimicamente ligada, quanto ao efeito da solução aquosa sobre a FE foi a porcentagem do componente aquoso. A porcentagem de componente aquoso na FM foi monitorada através do número de pratos do pico do naftaleno na mistura teste padrão separada pela fase C_{18} . Foram avaliadas fases móveis com 40, 50 e 60 % de componente aquoso constituída por uma solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 13.

Figura 13. Variação do número de pratos em uma fase C_{18} quimicamente ligada comercial sob diferentes composições da fase móvel constituída de solução fosfato. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (variação da porcentagem de solvente aquoso), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm .



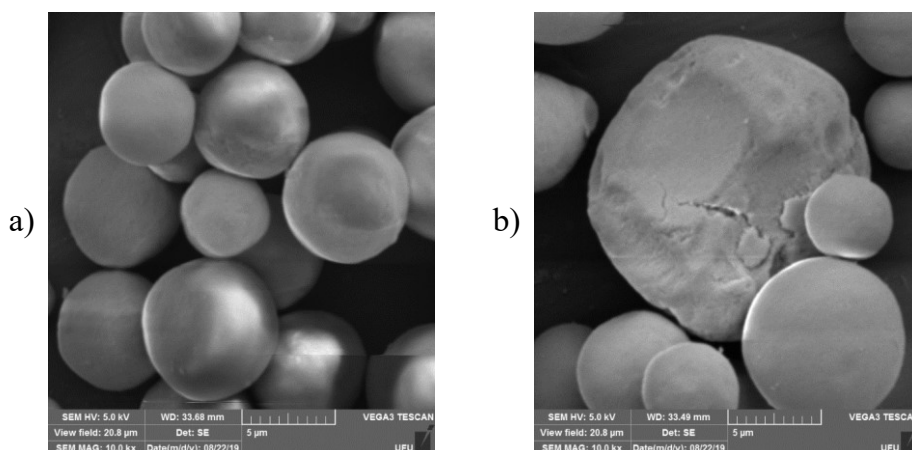
De acordo com a Figura 13, o aumento da porcentagem de componente aquoso leva a um prolongamento da vida útil da coluna, principalmente quando superior a 50 % da fase móvel. As viscosidades da mistura MeOH:H₂O na temperatura analisada equivalem a 1,00; 1,02 e 0,98 cP para as proporções com 40, 50 e 60 % de metanol na fase móvel, respectivamente (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Quanto menor a viscosidade da fase móvel, maior é o acesso a microporos e poros capilarizados das partículas de fase estacionária, levando a uma degradação mais rápida da fase estacionária. Nesse caso, a contribuição da viscosidade na taxa de degradação do material é pequena. No entanto, o aumento do teor de solvente orgânico na fase móvel aumenta o valor do pKa do ácido usado para a preparação da solução tampão, aumentando o pH da fase móvel e, dessa forma, degradando mais rapidamente a fase estacionária (ESPINOSA; BOSCH; ROSÉS, 2002). No entanto, fases reversas como a C₁₈ sofrem colapso das cadeias alquilas quando porcentagens elevadas de água ou soluções aquosas, > 90 %, são empregadas na fase móvel (KIRKLAND, 2004).

4.3 Caracterização físico-química da fase C₁₈ antes e após o estudo de degradação

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível avaliar a morfologia das partículas da fase estacionária C₁₈ antes e depois da avaliação do método de degradação rápida, no qual as condições de análise da FE avaliada foram: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), temperatura de 45 °C. As micrografias obtidas, com ampliação de 5000 e 10000 vezes, para a fase C₁₈ antes e após a aplicação do método de degradação rápida estão apresentadas na Figura 14.

Figura 14. Imagens por MEV das partículas da fase estacionária C_{18} comercial a) antes e b) após o estudo de degradação rápida, empregando as condições definidas no desenvolvimento do método.



Analisando as micrografias da fase C_{18} antes e depois do estudo de degradação apresentadas na Figura 14 a) e b), respectivamente, observa-se que houve uma deformação da partícula de sílica com a realização do teste de degradação, corroborando com os resultados obtidos cromatograficamente. Na Figura 14b, observam-se irregularidades na superfície da sílica, as quais indicam que as partículas de sílica perderam a regularidade do seu formato esférico, devido a dissolução parcial das partículas com a passagem de fase móvel em condições degradantes, indicando que houve lixiviação do leito cromatográfico.

4.3.2 Área superficial específica e porosidade

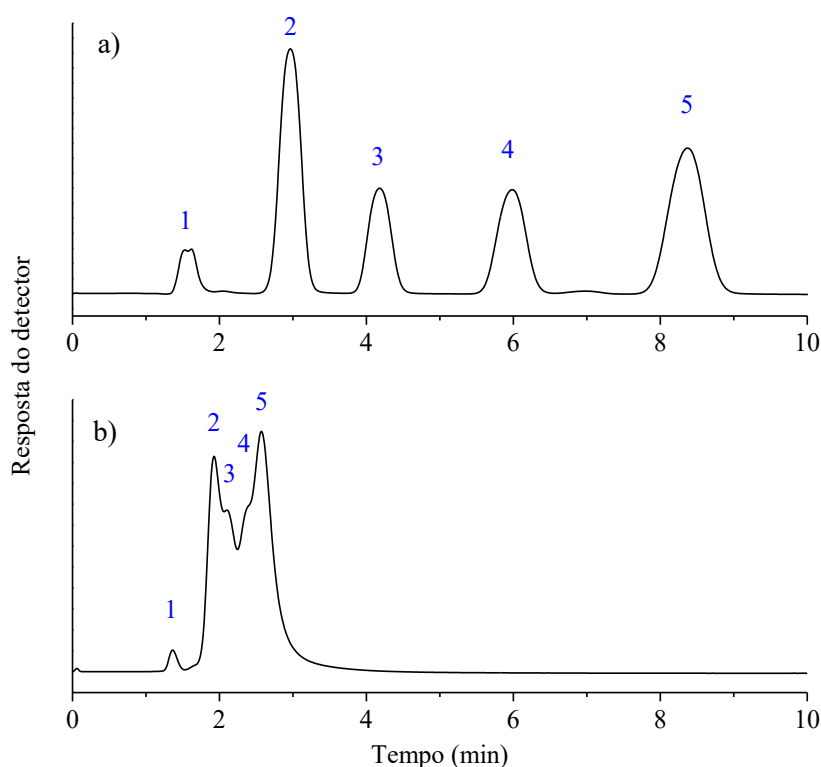
A fase C_{18} foi analisada quanto às suas características de área superficial específica e porosidade a fim de avaliar propriedades morfológicas das partículas. Os resultados obtidos para a fase estacionária C_{18} foram comparados com o antes e o depois da degradação, na qual as condições de análise da FE avaliadas empregaram fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10,00 (60:40, v/v), vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de coluna a 45°C . Os resultados obtidos na análise de área superficial e porosidade das partículas C_{18} estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades morfológicas da fase estacionária C_{18} quimicamente ligada antes e após o estudo de degradação.

Propriedades morfológicas	Antes do teste	Após o teste
Área superficial específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	$163,1 \pm 0,7$	$169,8 \pm 1,9$
Volume de poros ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	$0,51 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,02$
Diâmetro de poros (nm)	$12,55 \pm 0,04$	$12,74 \pm 0,09$

De acordo com a Tabela 2, observa-se que ocorre um ligeiro aumento das propriedades morfológicas das partículas SiC_{18} após o teste de degradação, confirmando o ataque da fase móvel à sua estrutura de poros e alterando a área superficial específica e porosidade da FE devido à solubilização de parte do suporte de sílica. Após o estudo de degradação além da perda de eficiência e dos parâmetros morfológicos e estruturais, a fase estacionária perde a capacidade de separação cromatográfica como apresentado na Figura 15.

Figura 15. Cromatograma da separação da mistura teste padrão a) antes e b) após o estudo de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm .

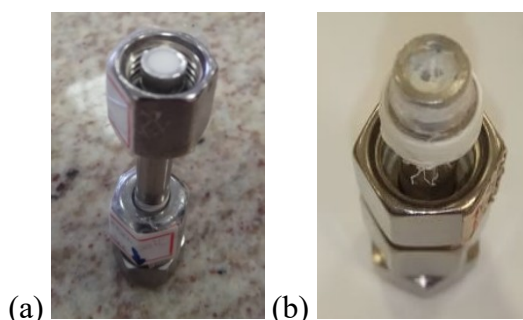


A Figura 15a apresenta o cromatograma obtido antes do estudo de degradação, indicando uma boa capacidade de separação da fase C_{18} , realizando a separação total da mistura teste. Após passada as 24 horas de aplicação do método desenvolvido para a degradação rápida da FE com a

fase C₁₈ comercial foi obtido o cromatograma da Figura 15b, o qual já não apresenta separação dos componentes da mistura indicando que a fase C₁₈ perdeu a capacidade de separação devido aos fatores que foram apresentados e discutidos no decorrer desse trabalho referentes à dissolução da sílica.

O efeito das condições de temperatura e do uso de tampão inorgânico a pH 10 sobre a estrutura física e morfológica das partículas de uma fase estacionária C₁₈ típica, empregada na CLAE, é apresentado nas Figura 16a e Figura 16b.

Figura 16. Imagens da fase estacionária C₁₈ comercial dentro da coluna cromatográfica, (a) antes e (b) após o estudo de degradação.

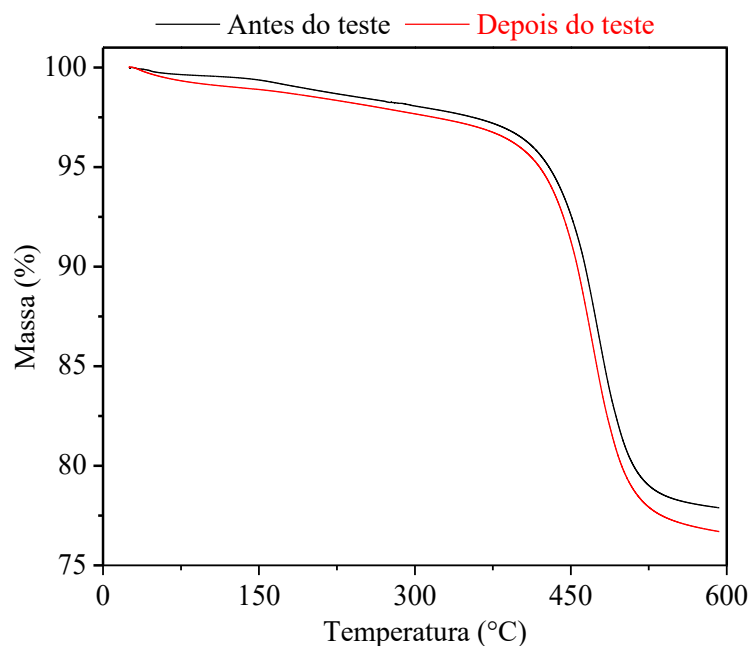


Como pode ser observado na Figura 16, sob as condições empregadas para a fase Kromasil C₁₈ no estudo de estabilidade ocorre a solubilização do leito cromatográfico e, conseqüentemente, as alterações nas propriedades morfológicas da FE.

4.3.3 Análise termogravimétrica

A fase C₁₈, antes e após o estudo de degradação, foi analisada por termogravimetria (TGA) para avaliar as características físico-químicas envolvidas na perda de massa da fase na aplicação do método de degradação rápida, sendo o resultado obtido apresentado na Figura 17.

Figura 17. Curva TG obtida para a fase estacionária C₁₈ antes e após a aplicação do método de degradação.



Analisando as curvas termogravimétricas (TG) apresentadas na Figura 17, observam-se pelo menos dois eventos principais de perdas de massa da fase C₁₈, tanto antes quanto após o teste de degradação rápida, um primeiro que registra uma perda branda, porém contínua, de massa entre 25 °C e 400 °C e um segundo que registra uma perda acentuada da massa entre 400 e 600 °C. Portanto, as duas curvas TG apresentam perfis muito similares, mas é importante enfatizar que para cada situação tem-se uma perda relativa de massa. O primeiro evento pode ser relacionado a perda de moléculas de água adsorvidas na fase C₁₈, bem como de moléculas de C₁₈ que sofrem hidrólise catalisada pelo aquecimento do material. O segundo evento refere-se a perda do material orgânico da fase, ou seja, a decomposição das moléculas de C₁₈. Definidos os dois eventos, podemos observar que a perda total de massa da fase C₁₈ após o método de degradação rápida é ligeiramente maior, cerca de 1,18 % que da fase C₁₈ antes do método. Essa perda maior pode estar associada ao ataque da fase móvel sob condições de degradação do material que solubilizou parte do suporte de sílica promovendo a perda da fase estacionária. Esta condição é reforçada pela menor quantidade de resíduos (suporte de sílica) após 600 °C na curva TG para a fase C₁₈ pós método de degradação.

4.4 Avaliação da estabilidade de FE aplicando o método de degradação rápida

As FE produzidas no CroMat no período de 2009 a 2018 apresentam como características principais o baixo custo de preparação e a seletividade intrínseca atribuída aos diferentes polímeros que foram imobilizados sobre a superfície do suporte cromatográfico, seja ele de sílica

pura ou sílica aluminizada. Após otimizado e caracterizado o método de degradação rápida das fases estacionárias para CLAE-FR, o mesmo foi utilizado para avaliar a vida útil das FE preparadas no CroMat e, assim, avaliar o efeito do tipo de polímero e do tipo de suporte utilizados.

É importante salientar que o método de degradação das fases estacionárias aqui desenvolvido pode ser considerado cerca de 50 vezes mais rápido para a degradação das FE, caso as mesmas fossem avaliadas sob condições brandas de fase móvel (GUILLARME; VEUTHEY, 2020). Segundo Guillarme e Veuthey, fases reversas convencionais podem durar até 20.000 volumes de coluna e sob as condições do método uma fase C₁₈ típica apresentou estabilidade por cerca de 400 volumes de coluna. Logo, para avaliar a durabilidade das fases preparadas no CroMat, podemos considerar que os volumes de colunas obtidos multiplicados por um fator de 50, correspondem ao seu tempo de vida útil. Ainda, os autores consideram que para cada 10 volumes de coluna, é realizada uma análise cromatográfica.

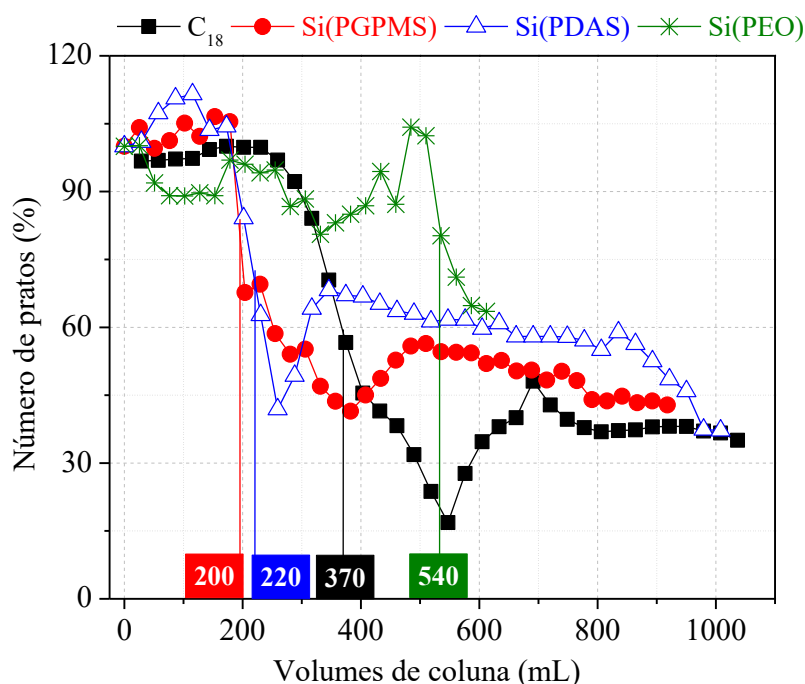
4.4.1 Efeito do tipo de polímero na vida útil das FE imobilizadas com polímero

Empregando o método de degradação rápida das fases estacionárias, fez-se a avaliação das FE produzidas no CroMat ao longo dos últimos anos e também realizou-se uma comparação com uma fase C₁₈ comercial. As FE preparadas no laboratório avaliadas neste estudo foram a Si(PGPMS), Si(PEO) e Si(PDAS), monitorando os números de pratos para o pico do naftaleno durante a passagem da fase móvel nas condições MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10,00 (60:40, v/v), vazão de 0,4 mL min⁻¹ e temperatura de 45 °C. Na Figura 18 é apresentado o gráfico da estabilidade destas fases estacionárias sob as condições de degradação monitorando o número de pratos para o pico do naftaleno na mistura teste padrão.

Avaliando os resultados apresentados na Figura 18, observa-se que a coluna recheada com Si(PGPMS) e Si(PDAS) apresentaram estabilidades menores que a coluna C₁₈, enquanto a fase Si(PEO) foi a mais estável, cerca de 170 volumes de coluna a mais que a FE comercial, empregando o método de degradação rápida. As fases Si(PGPMS) e Si(PDAS) apresentaram estabilidades químicas similares. A maior estabilidade da fase Si(PEO) pode estar relacionada a estrutura do polímero, cadeias laterais mais curtas e mais polares, e ao maior recobrimento da superfície das partículas quando comparado ao PGPMS e ao PDAS (SANTOS, 2016; GAMA, 2017; CARVALHO, 2017). A cadeia lateral mais curta provavelmente fornece uma camada de recobrimento mais uniforme da superfície do suporte e sua maior polaridade pode promover

melhor interação com os grupos ativos da superfície da sílica, fornecendo uma maior proteção ao suporte de sílica.

Figura 18. Estabilidade das fases estacionárias Si(PGPMS), Si(PDAS), Si(PEO) e uma fase C_{18} comercial a partir da aplicação do método de degradação rápida de FE monitorando o número de pratos para o pico do naftaleno na mistura teste padrão. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm .

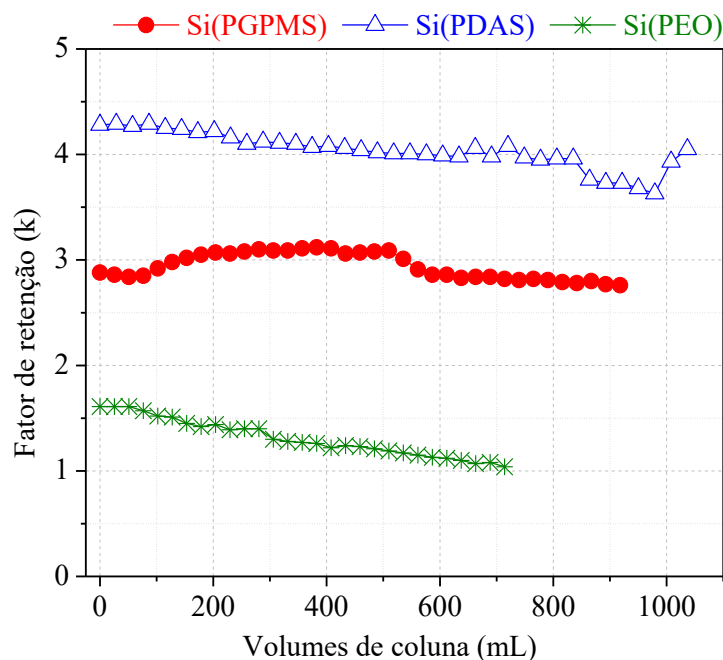


Outro parâmetro cromatográfico monitorado durante o estudo de estabilidade das FE preparadas em laboratório foi o fator de retenção. Para a avaliação do fator de retenção, o pico do naftaleno foi utilizado para o cálculo do parâmetro durante a eluição da fase móvel sob condições de degradação. A Figura 19 apresenta a estabilidade das fases estacionárias imobilizadas com diferentes polímeros ao longo da passagem da fase móvel alcalina, monitorando o fator de retenção do pico do naftaleno.

De acordo com a Figura 19, as fases estacionárias não apresentam variação significativa do fator de retenção para o pico do naftaleno, sendo a Si(PGPMS) a mais estável entre as fases estacionárias durante a passagem da fase móvel sob as condições de degradação. Apesar das colunas cromatográficas terem perdido o desempenho, indicado pela queda brusca do número de pratos conforme a Figura 18, a retenção dos compostos não varia de forma similar ao número de pratos, permanecendo praticamente constante, durante todo o estudo. Observa-se também que os perfis de estabilidade dos fatores de retenção para as fases estacionárias indicam o grau de

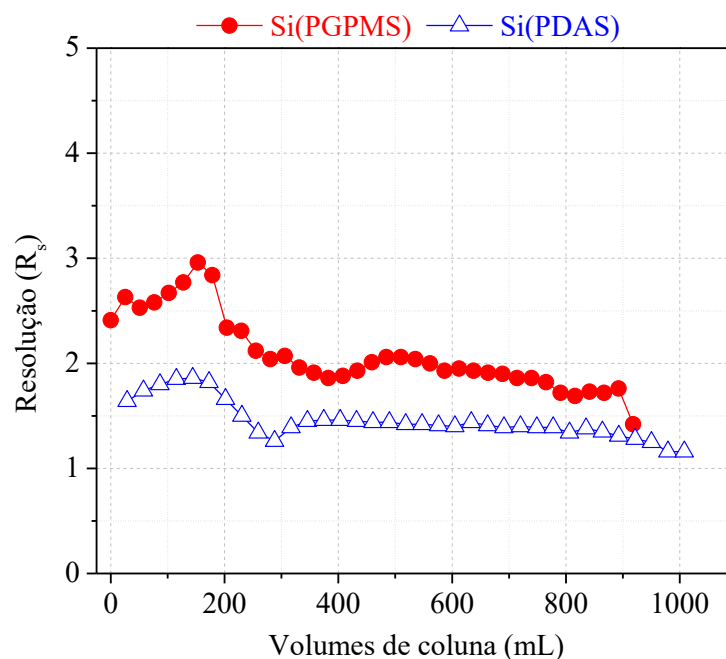
hidrofobicidade das mesmas, sendo a ordem decrescente de hidrofobicidade igual a PDAS > PGPMS > PEO.

Figura 19. Variação do fator de retenção para o pico do naftaleno nas fases Si(PDAS), Si(PGPMS) e Si(PEO), utilizando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm .



Para o monitoramento da resolução cromatográfica das FE durante a passagem de fase móvel degradante pelas fases estacionárias, foram monitorados os picos do tolueno e do naftaleno nos cromatogramas, e os resultados são apresentados na Figura 20. O estudo foi realizado apenas para as fases Si(PGPMS) e Si(PDAS), pois a fase Si(PEO) com as condições empregadas no estudo e sua maior polaridade não foi capaz de separar os picos do naftaleno e do tolueno, sendo este último retirado da mistura para não prejudicar as demais medidas para o naftaleno.

Figura 20. Resolução entre os picos do tolueno e do naftaleno na separação da mistura teste padrão pelas fases estacionárias Si(PGPMS) e Si(PDAS), utilizando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10.



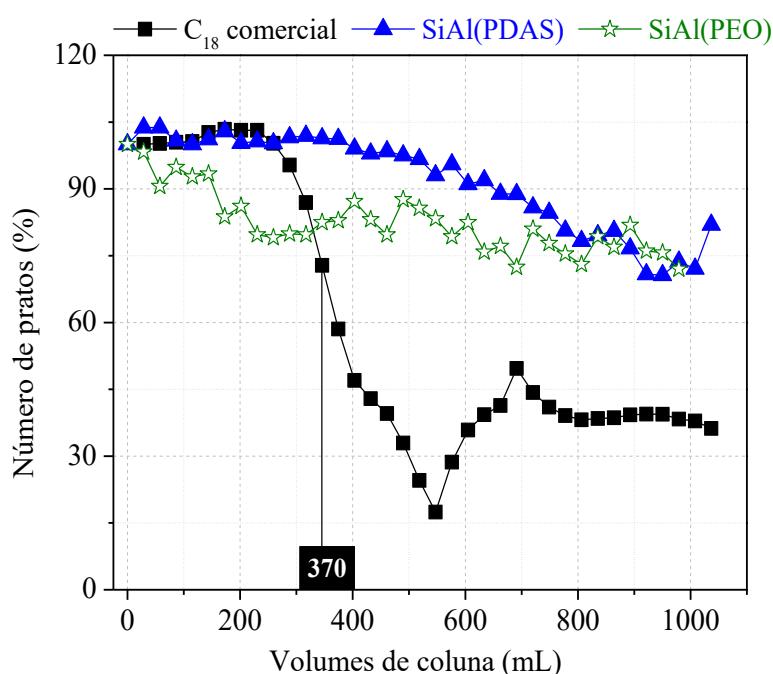
De acordo com a Figura 20, pode-se observar que a mesma queda ocorrida para o número de pratos do pico do naftaleno registrada durante a passagem da fase móvel para as fases Si(PGPMS) e Si(PDAS) é registrada para os valores de resolução cromatográfica entre os picos do tolueno e naftaleno, ou seja, a separação entre o tolueno e o naftaleno apresenta uma variação mais brusca em 200 e 220 volumes de coluna para o Si(PGPMS) e o Si(PDAS), respectivamente. A capacidade de separação da fase Si(PDAS) para os picos dos compostos foi perdida a partir dessa queda, na qual o valor de resolução ficou abaixo de 1,5, valor limite para a separação de dois picos na linha de base do cromatograma. Já para a fase Si(PGPMS) a perda da capacidade de separação entre os picos do naftaleno e tolueno ocorreu apenas após 900 volumes de coluna, apesar dos picos já apresentarem alargamento suficientemente elevado tornando a FE inútil para aplicações cromatográficas já a partir de 220 volumes de coluna.

4.4.2 Efeito do tipo de suporte cromatográfico na vida útil das FE

Como observado no estudo da estabilidade das fases preparadas em laboratório, algumas delas apresentam estabilidade inferior a colunas comerciais a base de C_{18} quimicamente ligadas. Desta forma, suportes de sílica mais resistentes foram preparados no CroMat a partir do recobrimento da sílica com nanopartículas de alumina, que apresenta estabilidade na faixa de pH

1 a 13, e empregados na preparação de fases estacionárias a base de PDAS e PEO. As fases SiAl(PEO) e SiAl(PDAS) foram preparadas pela imobilização térmica dos respectivos polímeros sobre partículas de sílica aluminizada (SANTOS, 2016; SOUZA, 2016). A estabilidade dessas fases foi medida pelo número de pratos para o pico do naftaleno, que foi monitorado pela passagem da fase móvel de acordo com as condições otimizadas no método de degradação. A Figura 21 apresenta a variação do número de pratos das fases preparadas em suporte de sílica aluminizada e a comparação com a coluna comercial recheada com C₁₈ quimicamente ligado.

Figura 21. Variação do número de pratos para o pico do naftaleno obtido na separação da mistura teste padrão pelas fases estacionárias SiAl(PEO), SiAl(PDAS) e C₁₈, empregando o método de degradação rápida. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm.

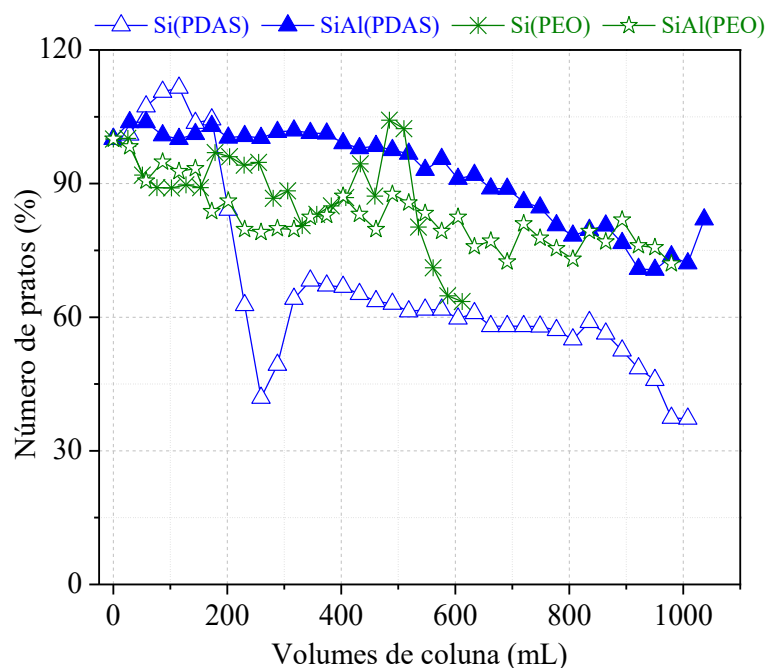


É possível observar pela Figura 21 que as fases SiAl(PDAS) e SiAl(PEO) após 1000 volumes de coluna tiveram uma perda de aproximadamente 30 % da suas eficiências de coluna iniciais, não apresentando um registro de perda brusca da eficiência, o que indica que suas capacidades de separação são mantidas dentro do período estudado. A fina camada de nanopartículas de alumina incorporada na superfície da sílica conferiu aos materiais uma estabilidade maior, proveniente do óxido de alumínio, que é estável na faixa de pH de 1 a 13. Assim, as fases SiAl(PEO) e SiAl(PDAS) se mostraram estáveis frente às condições alcalinas de fase móvel, essa estabilidade está associada a presença de nanopartículas de alumina no suporte cromatográfico, além do recobrimento mais eficiente da camada polimérica de PEO, que já havia

sido observada anteriormente. A utilização do polímero orgânico, juntamente com a alumina faz com que a fase estacionária tenha um ganho de vida útil sem que haja perda de seletividade do material, diferente da fase C₁₈ à qual é ligada quimicamente a superfície da sílica, fazendo com que a perda da eficiência ocorra antes de 400 volumes de coluna.

Uma comparação entre as fases estacionárias contendo os mesmos polímeros imobilizados sobre suportes de sílica e sílica aluminizada foi então realizada para avaliar o efeito da presença da alumina no suporte cromatográfico quanto à estabilidade das FE imobilizadas com polímeros. O resultado dessa comparação pode ser observado na Figura 22.

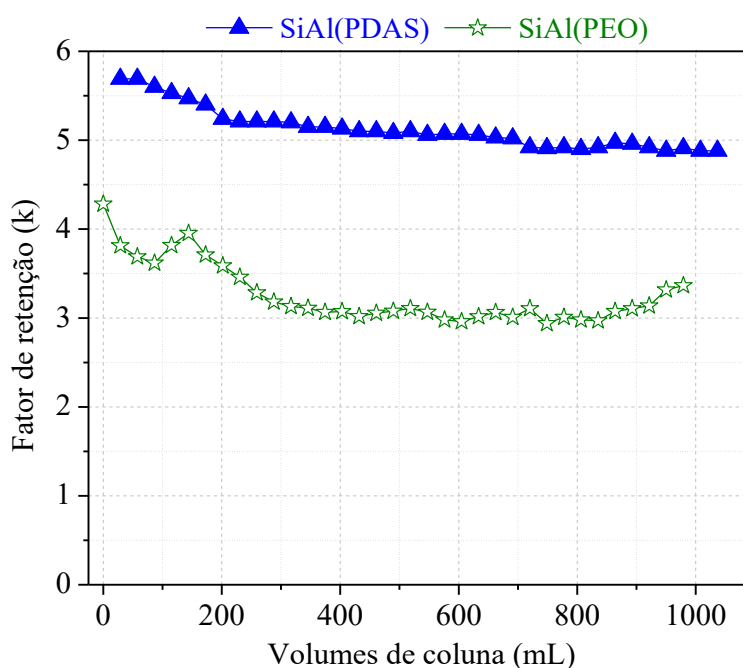
Figura 22. Comparação entre as estabilidades químicas das fases imobilizadas sobre sílica e sílica aluminizada, utilizando o método de degradação rápida a partir do monitoramento do número de pratos para o pico do naftaleno. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm.



De acordo com a Figura 22, pode ser observado que o ganho de estabilidade das fases estacionárias com o suporte de sílica aluminizada independe do tipo de polímero empregado no recobrimento do suporte. As fases SiAl(PEO) e SiAl(PDAS) apresentam uma perda contínua, porém branda de seu desempenho ao longo do estudo, sem que ocorra a morte da coluna (registrado pela queda brusca do número de pratos, normalmente abaixo de 50 % do valor inicial), indicando a resistência do suporte ao ataque da fase móvel alcalina. Logo, este resultado confirma a viabilidade de incorporação da alumina no suporte de sílica, visando ganho de estabilidade das fases estacionárias.

O fator de retenção para o pico do naftaleno na separação da mistura teste padrão também foi monitorado durante o estudo de degradação das fases estacionárias. A Figura 23 apresenta a variação do fator de retenção do pico do naftaleno nas fases SiAl(PDAS) e SiAl(PEO) ao empregar o método de degradação das FE.

Figura 23. Variação do fator de retenção para o pico do naftaleno nas fases SiAl(PDAS) e SiAl(PEO), empregando o método de degradação de fases estacionárias. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a 0,025 mol L⁻¹ a pH 10 (60:40, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, temperatura de 45 °C e detecção UV a 254 nm.

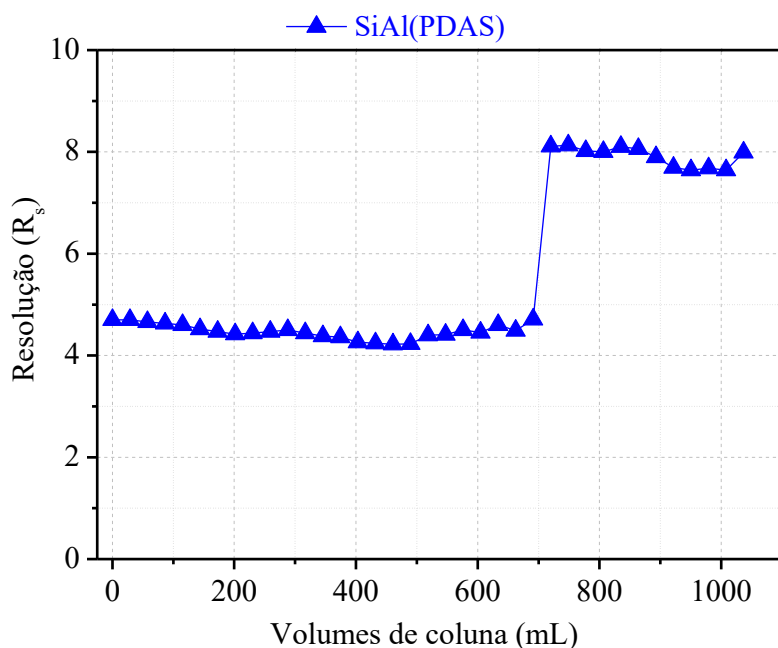


Analisando os resultados obtidos na Figura 23, pode-se observar que os fatores de retenção para o pico do naftaleno apresentaram uma ligeira queda ao longo do estudo, indicando a pequena perda dos polímeros PEO e PDAS. Essa perda de polímero possivelmente pode estar associada a pequenas frações não fixadas adequadamente no suporte cromatográfico. Pode ser observado também que as fases SiAl(PDAS) e SiAl(PEO) apresentam ganho de retenção hidrofóbica quando comparado com as retenções do naftaleno nas contrapartes à base de sílica, Si(PDAS) e Si(PEO). Assim, aparentemente a presença de alumínio no suporte cromatográfico além de fornecer maior estabilidade química às FE em condições alcalinas também fornece maior hidrofobicidade ao recobrimento, aumentando a retenção de compostos hidrofóbicos.

A resolução entre os picos do tolueno e naftaleno também foi analisada ao longo da passagem de fase móvel em condições de degradação. Porém, essa medida foi realizada apenas para a fase SiAl(PDAS), uma vez que na fase SiAl(PEO) não apresentou separação entre os

picos do tolueno e naftaleno devido à alta hidrofiliicidade da superfície da fase SiAl(PEO) (SANTOS, 2019). A variação da resolução entre os picos do naftaleno e tolueno na fase SiAl(PDAS) empregando o método de degradação rápida é apresentada na Figura 24.

Figura 24. Variação da resolução entre os picos do tolueno e naftaleno na fase SiAl(PDAS), utilizando o método de degradação rápida de fases estacionárias. Condições de análise: fase móvel MeOH:solução fosfato a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 10 (60:40, v/v), vazão $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 45°C e detecção UV a 254 nm .



A separação entre os picos do tolueno e naftaleno na fase SiAl(PDAS) durante toda a passagem da fase móvel alcalina permaneceu praticamente constante até 650 volumes de coluna, Figura 24. Após esse volume ocorre um aumento da distância entre os picos no cromatograma, resultando em um maior valor de resolução, provavelmente devido a rearranjos do leito cromatográfico com a pequena perda de fase estacionária ao longo do estudo.

Comparando-se as fases estudadas neste trabalho, pode-se dizer que as colunas que apresentam maior estabilidade sobre a coluna C_{18} são as que possuem partículas de alumina incorporadas na superfície da sílica. Esta estabilidade maior pode ser atribuída à fina camada do óxido de alumínio que é estável na faixa de pH de 1 a 13 além do recobrimento eficiente fornecido pela camada polimérica de PEO e PDAS.

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que foi possível desenvolver um método para avaliação da estabilidade de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. Além de ser um método rápido, de forma que economiza tempo de uso de equipamentos, reagentes e solventes, este método pode ser aplicado em FE quimicamente ligadas

ou imobilizadas por polímeros, apresentando o tempo de vida útil dessas fases quando expostas a fatores degradantes de análise.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que condições experimentais de análise amplamente empregadas nas mais diversas separações cromatográficas afetam a durabilidade das colunas recheadas com fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência no modo de fase reversa. Apesar da importância do uso de tampões, da temperatura e do ajuste de pH para garantir eficiência e repetibilidade das análises cromatográficas para diversas substâncias, a vida útil das colunas cromatográficas é reduzida significativamente sob tais condições, principalmente se combinadas. O pH, o tipo de tampão e a concentração do sal na fase móvel são, nessa ordem, as variáveis que afetam mais drasticamente a vida útil da coluna cromatográfica. A temperatura de coluna também acelera a degradação da fase estacionária, em especial, acima de 40 °C. No entanto, o uso de tampões de sais orgânicos, em concentrações mais baixas e com temperaturas inferiores a 40 °C podem garantir maior vida útil às colunas cromatográficas, bem como eficiência e repetibilidade de retenção para os solutos, devido ao efeito menos drástico de degradação da fase estacionária.

No processo de degradação, foram estabelecidas condições intermediárias de alguns dos fatores estudados por permitirem a análise da vida útil de uma coluna cromatográfica e a comparação entre diferentes fases estacionárias, preparadas em laboratório ou comerciais, podendo assim definir as melhores condições de degradação para o método estudado. As condições definidas para o método de degradação rápida foram: pH da fase móvel igual a 10,00; componente aquoso constituído de solução fosfato em concentração de 0,025 mol L⁻¹; temperatura do forno de coluna de 45 °C, e; composição da fase móvel com 60 % de metanol e 40 % da solução fosfato.

As fases estacionárias com polímeros imobilizados se mostraram seletivas na separação de compostos polares como visto nos trabalhos do Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia da UFU, no entanto, as suas estabilidades dependem do tipo de polímero e da característica do suporte cromatográfico. As fases estacionárias que possuem partículas de alumina no suporte e recobertas por polímeros possuem estabilidades superiores à fases comerciais. Esse estudo mostra a potencialidade das fases Si(PEO), SiAl(PEO) e SiAl(PDAS) serem aplicadas comercialmente, pois, tem um menor custo e possuem vida útil maior que a fase comercial quimicamente ligadas, C₁₈.

REFERÊNCIAS

- AMPARO, M. R.; MARQUES, F. A.; FARIA, A. M. Synthesis and characterization of a novel stationary phase, Si-Zr/Ti (PMTDS), based upon ternary oxide support for high performance liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 1512-1519, 2013. DOI: 10.5935/0103-5053.20130192.
- BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Preparation and characterization of a new microwave immobilized poly(2-phenylpropyl)methylsiloxane stationary phase for reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1297, p. 113-122, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.070.
- BERTHOD, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *Journal of Chromatography*, v. 549, p. 1-28, 1991. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)91415-8.
- BOTTOLI, C.B.G. Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- BOTTOLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1030, p. 217-223, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.107.
- BUCHMEISER, M. R. New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 233-266, 2001. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00129-1.
- BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 231-247, 2012. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- CARVALHO, G. O., SILVA, C. G. A., FARIA, A. M. A New Stationary Phase for Analysis of Hydrophobic Compounds by RP-LC. *Chromatographia*, v. 79, p. 19-27, 2016. DOI: 10.1007/s10337-015-2993-9.
- CARVALHO, G. O. Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas em poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica para cromatografia líquida de interação hidrofílica. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- CHESTER, T. L. Recent developments in high-performance liquid chromatography stationary phases. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 579-589, 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2016.04.001.
- CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1060, p. 23-31, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.098.
- CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A.; KIRKLAND, J. J. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1996. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00904-3.

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

COLLINS, C. H.; SILVA, C. R.; FARIA, A. M.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. The search for more pH stable stationary phases for high performance liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 604-612, 2009. DOI: 10.1590/S0103-50532009000400004.

COYM, J. W. Comparison of retention on traditional alkyl, polar endcapped, and polar embedded group stationary phases. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 1712-1718, 2008. DOI: 10.1002/jssc.200700483.

DIB, S. R.; FARIA, A. M. Polyethyleneimine immobilized on silica endcapped with octadecyl groups as a stationary phase for RP-LC. *Chromatographia*, v. 77, p. 533-5541, 2014. DOI: 10.1007/s10337-014-2649-1.

DUN, H.; ZHANG, W.; WEI, Y.; XIUQING, S.; LI, Y.; CHEN, L. Layer-by-layer self-assembly of multilayer zirconia nanoparticles on silica spheres for HPLC packings. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 5016-5023, 2004. DOI: 10.1021/ac030389j.

DUNLAP, C. J.; MCNEFF, C. V.; STOLL, D.; CARR, P. W. Zirconia stationary phases for extreme separations. *Analytical Chemistry*, v. 73, p. 598A-607A, 2001. DOI: 10.1021/ac012530z.

ESPINOSA, S.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Retention of ionizable compounds on HPLC. 12. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile - water mobile phases that influence HPLC retention. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 3809-3818, 2002. DOI: 10.1021/ac020012y.

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

FARIA, A.M., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1385-1398, 2009. DOI: 10.1590/S0103-50532009000800002.

FONSECA, D. A.; GUTIÉRREZ, H. R.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability. *Journal of Chromatography A*, v. 1030, p. 149-155, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.12.033.

GAMA, V. S. Otimização das condições de imobilização de poli(glicidoxipropilmetilsiloxano) sobre sílica no preparo de fase estacionária polar para CLAE. 2017. 50 f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2017.

GREGG, S. J.; SING, K.S.W. The physical adsorption of gases by nonporous solids: The type II isotherm. In Adsorption, surface area and porosity. Londres: Academic Press, 1982.

GRÜN, M.; KURGANOV, A. A.; SCHACHT, S.; SCHÜTH, F.; UNGER, K. K. Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 740, p. 1-9, 1996. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00205-1.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 692, p. 1-25, 2011. DOI: 10.1016/j.aca.2011.02.047.

JARDIM, I. C. S. F., MALDANER, L., LOURENÇO, J.; FIORAVANTI, L. M., COLLINS, C.H. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 2917-2929, 2010. DOI: 10.1002/jssc.201000313.

JARONIEC, C. P.; JARONIEC, M.; KRUK, M. Comparative studies of structural and surface properties of porous inorganic oxides used in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 797, p. 93-102, 1998. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00998-9.

KIRKLAND, J. J. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *Journal of Chromatography A*, v. 1060, p. 9-21, 2004. DOI: 10.1016/S0021-9673(04)01892-8.

KIRKLAND, J. J.; HENDERSON, J. W.; DESTEFANO, J. J.; VAN STRATEN, M. A.; CLAESSENS, H. A. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 762, p. 97-112, 1997. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00945-4.

KIRKLAND, J. J.; VAN STRATEN, M. A.; CLAESSENS, H. A. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*, v. 691, p. 3-19, 1995. DOI: 10.1016/0021-9673(94)00631-I.

KURGANOV, A.; DAVANKOV, V.; ISAVEJA, T.; UNGER, K. K.; EISENBEISS, F. Characterization of covalently bonded and adsorbed polymer coatings on silica, alumina and zirconia by means of physico-chemical and chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, v. 660, p. 97-111, 1994. DOI: 10.1016/0021-9673(94)85103-4.

LI, J.; CARR, P. W. Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using polybutadiene-coated zirconia. *Analytical Chemistry*, v. 69, p. 2202-2206, 1997. DOI: 10.1021/ac9608681.

LI, J.; HUE, Y.; CARR, P. W. Fast separations at elevated temperatures on polybutadiene-coated zirconia reversed-phase material. *Analytical Chemistry*, v. 69, p. 3884-3888, 1997. DOI: 10.1021/ac9705069.

LOPES, N. P.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1030, p. 225-229, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.09.029.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700024.

MAJORS, R. Column Watch: New chromatography columns and accessories at the 1993 Pittsburgh Conference, Part 1. *LC-GC North American*. v. 11, p. 188-200, 1993.

MAO, Y.; FUNG, B. M. Use of alumina with anchored polymer coating as packing material for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 790, p. 9-15, 1997. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00718-8.

MEYER, V. R. Practical high-performance liquid chromatography. 5th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2010.

- NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; ZHAO, J.; McNEFF, C. V.; McCORMICK, A.; CARR, P. W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 31-62, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.050.
- NAWROCKI, J.; RIGNEY, M. P.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Chemistry of zirconia and its use in chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 657, p. 229-282, 1993. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80284-F.
- PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 952, p. 1-11, 2002. DOI: 0.1016/S0021-9673(00)00176-X.
- SANTOS, A. L. R. Preparação, otimização e caracterização de uma fase estacionária obtida pela imobilização térmica de poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) em partículas de sílica aluminizada. Trabalho de Conclusão (Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2016.
- SANTOS, A. L. R. Poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI: 10.14393/ufu.di.2019.337
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. A. Improved chemical stabilities for end-capped high performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto metalized silicas. *Journal of Chromatography A*, v. 1260, p. 81-87, 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.048.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. A. Stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto titanized silica for high-performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, v. 109, p. 150-157, 2013. DOI: 10.1016/j.microc.2012.03.009.
- SILVA, C. R.; AIROLDI, C.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Influence of the TiO₂ content on the chromatographic performance and high pH stability of C₁₈ titanized phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1114, p. 45-52, 2006. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.025.
- SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 27, p. 270-276, 2004. DOI: 10.1590/S0100-40422004000200017.
- SILVEIRA, J. L. R.; DIB, S. R.; FARIA, A. M. New support for high-performance liquid chromatography based on silica coated with alumina particles. *Analytical Sciences*, v. 30, p. 285-291, 2014. DOI: 10.2116/analsci.30.285.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New York: Wiley, 2010.
- SOUZA, L. L. Desenvolvimento de fase estacionária de baixa retenção hidrofóbica e maior estabilidade química à base de sílica aluminizada para CLAE-FR. Trabalho de Conclusão (Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2016.
- STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; TCHAPLA, A. Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I. *Chromatographia*, v. 53, p. S113-S131, 2001. DOI: 10.1007/BF02490319.

TANI, K.; SUZUKI, Y. Syntheses of spherical silica and titania from alkoxides on a laboratory scale. *Chromatographia*, v. 38, p. 291-294, 1994. DOI: 10.1007/BF02269770.

TANI, K.; SUZUKI, Y. Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 722, p. 129-134, 1996. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00456-4.

TEUTENBERG, T. Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 643, 1-12, 2009. DOI: 10.1016/j.aca.2009.04.008.

TEUTENBERG, T.; HOLLEBEKKERS, K.; WIESE, S.; BOERGERS, A. Temperature and pH-stability of commercial stationary phases. *Journal of Separation Science*, v. 32, p. 1262-1274, 2009. DOI: 10.1002/jssc.200800712.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, v. 25, p. 616-623, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000400017.

VANHOENACKER, G.; SANDRA, P. High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 390, p. 245-248, 2008. DOI: 10.1007/s00216-007-1671-7.

WEBER, T. P.; CARR, P. W. Comparison of isomer separation on carbon-clad microporous zirconia and on conventional reversed-phase high-performance liquid chromatography supports. *Analytical Chemistry*, v. 62, p. 2620-2625, 1999. DOI: 10.1021/ac00222a019.

ZHANG, C.; LIU, F.; LI, Y.; SHEN, X.; XU, X.; SAKAI, R.; SATOH, T.; KAKUCHI, T.; OKAMOTO, Y. Influence of stereoregularity and linkage groups on chiral recognition of poly(phenylacetylene) derivatives bearing L-leucine ethyl ester pendants as chiral stationary phases for HPLC. *Journal of Polymer Science, Part A*, v. 51, p. 2271-2278, 2013. DOI: 10.1002/pola.26611.

ZIZKOVSKY, V.; KUCERA, R.; KLIMES, J.; DOHNAL, J. Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1189, p. 83-91, 2008. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.12.017.