

NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS À BASE DE SÍLICA PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

César R. Silva, Isabel C. S. F. Jardim, Carol H. Collins e Claudio Airoidi*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP

Recebido em 20/3/03; aceito em 16/7/03

NEW STATIONARY PHASES BASED ON SILICA FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. The present work reviews recent advances in the preparation of new reversed phase packing materials such as sterically protected, bidentate, hybrid organic-inorganic and monolithic phases and phases containing embedded polar groups. The bonding chemistry involved in the preparation of these phases as well as their advantages over conventional C₈ and C₁₈ reversed phases are discussed. Understanding the reasons behind the development of these newer column packings helps analysts select the best stationary phase for a given application.

Keywords: stationary phases; embedded phases; HPLC.

INTRODUÇÃO

Apesar de existirem colunas recheadas com materiais poliméricos para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a sílica é o material mais utilizado como suporte devido à sua alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez e a grande eficiência obtida nas separações cromatográficas¹. Na década de 70, quando a CLAE começou a ser desenvolvida, a sílica utilizada² apresentava forma irregular e tamanho de partícula de 40 µm. Por volta de 1980, foi substituída por partículas menores e de morfologia esférica. O próximo avanço³ foi o uso de partículas com diâmetros cada vez menores, sendo que aquelas de 10 µm foram preferencialmente trocadas pelas de 5 e 3 µm. Atualmente, já existem colunas recheadas com partículas porosas de 1,6 micrômetros⁴.

Também ocorreram mudanças significativas quanto à pureza das sílicas, principalmente no método de obtenção destes materiais porosos. A sílica, que antes era obtida diretamente do silicato de sódio, agora passa a ser preparada através do processo sol-gel, empregando o tetraetoxissilano como fonte de SiO₂. Com a utilização de solventes e agentes surfactantes apropriados, sílicas de diferentes tamanhos e porosidades são obtidas⁵. Hoje é possível adquirir sílicas altamente puras, livres de contaminantes como ferro e alumínio. A presença desses metais M³⁺ e outros, como contaminantes na matriz de sílica, aumenta consideravelmente a acidez dos grupos silanóis (≡Si-OH), dificultando a análise de compostos básicos em condições de fase reversa⁶. Essas melhorias no suporte cromatográfico permitiram ganhos significativos na eficiência, estabilidade e reprodutibilidade das colunas⁷.

Alguns pesquisadores consideram que a modificação química da superfície da sílica parece não ter evoluído muito quando comparada com os métodos de obtenção da sílica, por ainda utilizar os mesmos organossilanos empregados há mais de trinta anos⁸. Entretanto, os pesquisadores engajados no desenvolvimento de novas colunas para CLAE conseguiram alguns melhoramentos para as fases quimicamente ligadas do tipo C₈ e C₁₈, através da reação de capeamento ou bloqueio dos grupos silanóis⁷.

Além da busca de novos materiais para serem utilizados como suporte cromatográfico e novos procedimentos de síntese para bloquear os silanóis residuais, novas fases estacionárias vêm sendo sin-

tetizadas, com o objetivo de obterem fases capazes de analisar diferentes compostos, incluindo os básicos, em uma ampla faixa de pH com considerável estabilidade química⁷. Dessa forma, a presente revisão relata os avanços mais recentes no desenvolvimento de novas fases estacionárias à base de sílica para serem usadas no modo reverso de eluição.

O material idealizado por qualquer analista engajado em separações cromatográficas deveria combinar as propriedades da sílica com a versatilidade dos materiais poliméricos a serem utilizados em uma ampla faixa de pH, com considerável estabilidade química e completa ausência dos silanóis residuais.

Apesar da sílica ainda ser o melhor suporte cromatográfico para o preparo das fases estacionárias, ela apresenta duas grandes limitações. A primeira restringe a sua utilização em uma faixa de pH de 2 até 8, para não ocorrer a degradação e a segunda refere a presença dos grupos silanóis residuais, os quais causam a assimetria de pico quando amostras básicas são analisadas.

Sabe-se que, em meio ácido em pH menor que 2, as ligações ≡Si-O-Si≡ que formam o esqueleto da sílica e são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície da sílica, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Dessa forma, os grupos orgânicos são mais facilmente lixiviados, quando se emprega fases móveis com pH abaixo de 2. Em meio básico, com pH acima de 8, os grupos hidroxilas (OH⁻) reagem facilmente com os silanóis residuais, promovendo a dissolução da sílica¹. Como consequência, o leito cromatográfico dentro da coluna é alterado, resultando em baixas eficiências e alargamento frontal de pico.

Para evitar esses problemas associados à sílica, alternativamente podem ser empregados os materiais poliméricos no recheio das colunas cromatográficas para CLAE. Entretanto, os polímeros não oferecem a mesma eficiência nas separações cromatográficas, apresentam uma resistência mecânica menor que a da sílica e, em determinados casos, alguns polímeros são incompatíveis com alguns solventes, resultando no seu intumescimento e até na sua dissolução. Essas desvantagens dos materiais poliméricos ainda são fatores decisivos para a escolha da sílica como suporte cromatográfico.

FASES REVERSAS COM POLÍMERO RECOBRINDO A SÍLICA

A preparação de fases reversas através da deposição e imobiliza-

*e-mail: airoidi@iqm.unicamp.br

ção de polialquilsiloxanos sobre a superfície da sílica cromatográfica foi inicialmente desenvolvida por Schomburg *et al.*⁹, na década de 80. No início, essas fases apresentavam baixa eficiência, o que era atribuído ao total preenchimento dos poros da sílica pelo filme polimérico, afetando drasticamente a transferência de massa e, conseqüentemente, a eficiência durante a separação cromatográfica. Com a otimização do processo de sorção e imobilização dos polímeros, hoje já se sabe que essas fases apresentam características semelhantes às fases quimicamente ligadas do tipo C₈ e C₁₈, inclusive quanto à eficiência cromatográfica¹⁰.

O principal objetivo deste procedimento é recobrir totalmente a superfície da sílica com uma fina camada do polímero, deixando os poros acessíveis e, assim, bloquear os grupos silanóis. Os polímeros mais freqüentemente utilizados são o poli(metiloctil)siloxano (PMOS)^{10,11} e o poli(metiloctadecil)siloxano (PMODS)¹², mas existem trabalhos na literatura que já utilizaram o polibutadieno^{13, 14} e o poliestireno¹⁵. O método de preparação destes materiais é bastante simples e as fases preparadas com o PMOS e PMODS apresentam boa eficiência. Uma descrição mais detalhada deste procedimento pode ser encontrado na revisão de Tonhi *et al.* publicada recentemente¹⁶.

FASES À BASE DE SÍLICA HÍBRIDA

Uma tentativa recente e bem sucedida de sintetizar esses novos materiais foi realizada pela Waters Corporation com a síntese da sílica híbrida através do processo sol-gel. Em 2001, por um processo de síntese já patenteado¹⁷, os pesquisadores empregaram a mistura de 2:1 tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTEOS) para sintetizar partículas esféricas de sílica híbrida, com tamanho apropriado e porosidade controlada¹⁸. A estrutura química das partículas porosas da sílica híbrida, sintetizadas, usando os dois organossilanos, está representada na Figura 1.

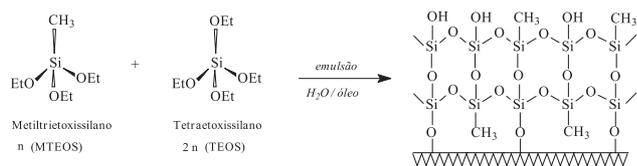


Figura 1. Representação da síntese e da estrutura das partículas de sílica híbrida de acordo com processo sol-gel desenvolvido pelos pesquisadores da Waters Corporation

Detalhes da síntese dessas partículas porosas e esféricas obviamente foram omitidos e estão protegidos na patente¹⁷. Provavelmente durante o processo sol-gel, os grupos etóxi dos dois organossilanos são hidrolisados na presença de um catalisador. Em uma segunda etapa, utilizando um meio reacional apropriado, os grupos silanóis, originados da hidrólise dos grupos etóxi, se condensam para formar as partículas esféricas de tamanho apropriado e porosidade controlada. A Waters já comercializa colunas cromatográficas recheadas com essas partículas de sílica híbrida, que são modificadas com agentes sililantes monofuncionais, contendo grupos polares do tipo carbamato inseridos e também com agentes sililantes trifuncionais. As estruturas dos materiais disponíveis comercialmente são mostradas na Figura 2.

O novo material híbrido poroso difere da sílica cromatográfica convencional por apresentar grupos metilas incorporados na matriz inorgânica da sílica. Esses grupos estão presentes na estrutura do material híbrido devido à utilização do precursor metiltrietoxissilano. A presença destes grupos hidrofóbicos confere a este material uma estabilidade química superior em relação ao suporte convencional, podendo ser utilizado em uma faixa de pH um pouco mais ampla

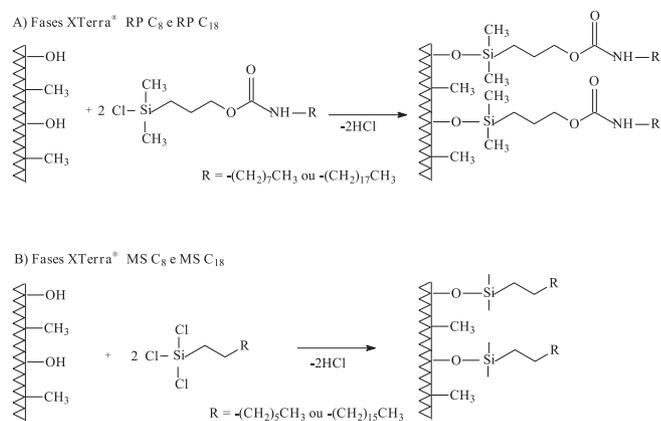


Figura 2. Representação das reações envolvidas na síntese das fases estacionárias a base de sílica híbrida, que são comercializadas pela Waters Corporation

que aquela empregada para a sílica pura e em temperaturas superiores à ambiente.

Cheng *et al.*¹⁸ demonstraram que as fases XTerra® à base de sílica híbrida podem ser empregadas em separações cromatográficas utilizando fases móveis com pH na faixa de 1,2 até 11,5 sem haver perda de eficiência da coluna. Outra vantagem relatada foi a realização de separações em temperaturas acima de 60 °C. Essas condições experimentais não são viáveis para as fases quimicamente ligadas à base de sílica pura devido à sua rápida degradação em temperaturas elevadas.

Outra possível vantagem é a baixa atividade dos grupos silanóis residuais nas fases à base de sílica híbrida. De fato, a sílica híbrida possui uma concentração de grupos silanóis menor que a sílica inorgânica devido à incorporação dos grupos metila, mas continua sendo impossível obter um recobrimento total dos silanóis no processo de modificação química com outros agentes sililantes.

Novas partículas híbridas estão sendo sintetizadas, substituindo o MTEOS por outros organossilanos bidentados do tipo (CH₃O)₃-Si-(CH₂)₃-Si-(CH₃O)₃, com o propósito de se obter materiais híbridos mais estáveis que os sintetizados inicialmente. Mais recentemente, os trialcóxissilanos contendo grupos funcionais do tipo amina, o [(3-amino)propil] trimetoxissilano, (CH₃O)₃-Si-(CH₂)₃-NH₂, e o viniltrimetoxissilano, tendo como grupo funcional na sua estrutura, o grupo vinila (CH₃O)₃-Si-CH=CH₂, também estão sendo empregados na síntese sol-gel em substituição ao MTEOS. O objetivo de sintetizar essas novas sílicas híbridas é a obtenção de novas fases estacionárias através da reação destes grupos funcionais pendentes com outras moléculas orgânicas¹⁹.

FASES ESTERICAMENTE PROTEGIDAS

A escolha de agentes sililantes monofuncionais, contendo grupos isopropila ou isobutila, ligados diretamente ao átomo de silício, permite a síntese das fases denominadas de estericamente protegidas²⁰. Essas fases foram inicialmente relatadas em 1989, com a finalidade de se obter fases mais estáveis que as convencionais do tipo C₈ e C₁₈. Essas fases estericamente protegidas foram desenvolvidas por Kirkland e Glajch, cuja invenção está também protegida por patente²¹ desde 1987. Hoje em dia, a Agilent Technologies comercializa essas fases estacionárias denominadas Zorbax StableBond®. Existem fases do tipo octil (C₈), octadecil (C₁₈) e cianopropil (CN) com os grupos volumosos ligados diretamente ao átomo de silício, como mostra o exemplo ilustrado na Figura 3.

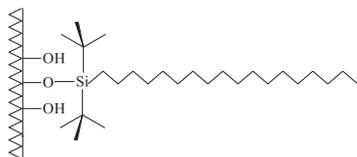


Figura 3. Estrutura da fase Zorbax SB-C18[®] da Agilent, com grupos isobutila ligados diretamente ao átomo de silício e uma cadeia n-alkila do tipo C₁₈

A tecnologia de inserir esses grupos hidrofóbicos e volumosos, próximos à superfície da sílica, permite que ela fique mais protegida principalmente em fase móvel com pH abaixo de 3, evitando a quebra das ligações do tipo siloxano, que são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na sua superfície²⁰.

O fabricante recomenda o emprego dessas fases em separações cromatográficas que requerem a utilização de uma fase móvel agressiva como, por exemplo, aquelas que contém ácido trifluoracético²⁰. Porém, a utilização de fases móveis em pH acima de 7 não é recomendada.

A propriedade dos grupos volumosos em bloquear os silanóis residuais parece ter sido erroneamente atribuída. Alguns resultados com o uso destas fases estacionárias na separação de compostos básicos em pH 7 mostraram uma atividade considerável de grupos silanóis residuais, devido ao baixo recobrimento da superfície²². A presença destes grupos volumosos deve dificultar a reação dos grupos reativos do silano com os silanóis da superfície da sílica.

Outra publicação mostrou que uma destas fases, a Zorbax-SB CN[®], é menos estável em fases móveis com pH superior a 7, em comparação com as fases monofuncionais, preparadas com os monoclorodimetilsilanos e também em relação às fases poliméricas preparadas com agentes sililantes trifuncionais como, por exemplo, o octadeciltriclorossilano ou o octadeciltrimetoxissilano²³. O motivo da baixa estabilidade está relacionado com o menor grau de recobrimento da superfície da sílica, quando se utiliza os silanos monofuncionais com os grupos isopropila ou isobutila.

FASES REVERSAS BIDENTADAS

Uma nova classe de fases reversas, denominadas bidentadas, foi recentemente preparada por Kirkland *et al.*²⁴. Essas fases são sintetizadas a partir da modificação da sílica cromatográfica com agentes sililantes bidentados formados por dois átomos de silício. O processo de síntese destes agentes sililantes é propriedade de duas patentes^{25,26}, agora pertencentes à Agilent. Essa empresa comercializa colunas recheadas com essa fase bidentada, com o nome de Zorbax Extend-C18[®]. A estrutura desta fase é mostrada na Figura 4.

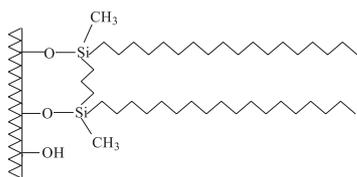


Figura 4. Estrutura química da fase bidentada Zorbax Extend-C18[®] da Agilent

Essas fases são denominadas bidentadas por apresentarem um grupo propila ligado a dois átomos de silício do agente sililante. A principal vantagem em relação às fases reversas monofuncionais é uma estabilidade relativamente maior em fases móveis agressivas

em pH acima de 7²⁴. O fabricante recomenda a utilização desta fase em separações com fase móvel em pH até 11.

Provavelmente, o grau de recobrimento da superfície da sílica com esse agente sililante bidentado é relativamente menor, quando comparado com aquele obtido para as sílicas modificadas com os agentes sililantes monofuncionais. Como consequência, a população dos grupos silanóis residuais é maior, tanto que o fabricante admite realizar o bloqueio dos silanóis em uma segunda etapa de reação. Porém, com as fases bidentadas reversas é possível realizar separações cromatográficas empregando fases móveis com pH elevado. Se o pH da fase móvel é maior que o valor de pKa dos analitos básicos, as moléculas estarão na forma não-protonada e os silanóis residuais na forma Si-O⁻. Nesta situação, a atividade dos silanóis residuais é mínima, evitando o alargamento de pico²⁴.

FASES MONOLÍTICAS

O conceito de fases monolíticas à base de sílica foi recentemente introduzido em CLAE. Essas colunas monolíticas diferem das colunas convencionais por não serem recheadas com partículas porosas de sílica. O recheio das colunas monolíticas também é um material poroso, mas apresenta poros com diferentes tamanhos. Nas colunas convencionais, o material particulado apresenta mesoporos de tamanho de 6 até 30 nm, enquanto que na fase monolítica o suporte cromatográfico possui uma estrutura tridimensional, com mesoporos em torno de 10 nm e macroporos de 2 µm de diâmetro. Essas fases foram desenvolvidas por pesquisadores da Universidade de Kyoto²⁷ em colaboração com a Merck KGaA da Alemanha²⁸. Essas colunas podem ser do tipo C₈ ou C₁₈ e estão disponíveis comercialmente desde 2000, com o nome de Chromolith Columns[®].

Esses monolitos são produzidos através de um processo sol-gel, empregando o tetrametoxissilano (TMOS) como fonte de sílica e agentes porogênicos apropriados (polietilenoglicol e uréia) em uma solução diluída de ácido²⁸. O interessante é que inicialmente os monolitos eram sintetizados dentro da coluna cromatográfica. Em alguma etapa do processo, a mistura apropriada era bombeada para dentro da coluna e em etapas subsequentes de geleificação e de calcinação, ocorria a formação da sílica monolítica. A etapa de modificação química destas fases com os agentes sililantes do tipo C₁₈ era realizada com o material já contido na coluna²⁹. Devido à baixa reprodutibilidade na síntese dessas colunas, os monolitos de sílica começam a ser sintetizados em um processo de batelada, bem como o processo de derivação com os reagentes organoclorossilanos. Subseqüentemente, os monolitos são cortados no tamanho desejado e colocados na coluna que, neste caso, é um tubo plástico.

A principal vantagem destas novas fases em relação às particuladas é a possibilidade de realizar separações rápidas, já que é possível utilizar altas vazões de fase móvel, graças aos macroporos que contribuem para uma transferência de massa rápida, sem ocasionar perdas de eficiência, nem aumento da pressão dentro da coluna³⁰. A estabilidade frente a fases móveis agressivas, assim como a atividade dos grupos silanóis residuais, ainda não foram relatadas na literatura, pelo fato dessas fases monolíticas terem sido lançadas no mercado recentemente.

FASES REVERSAS CONTENDO GRUPOS POLARES EMBUTIDOS

Novas fases estacionárias do tipo reversa para CLAE têm surgido desde o nascimento desta técnica analítica há mais de trinta anos atrás. A busca de novos materiais para serem utilizados como fase estacionária tem como objetivo principal obter novas fases capazes de analisarem compostos básicos sem o alargamento de pico,

comumente observado em condições de fase reversa. Dentre essas novas fases estacionárias, tem crescido o número de fases reversas que possuem grupos polares inseridos na cadeia n-alquila. Em um recente artigo, Przybyciel e Majors³¹ descrevem mais de vinte fases estacionárias com grupos polares de diferentes fornecedores, que foram lançadas no mercado nesses últimos anos.

Geralmente esses grupos polares encontram-se embutidos na cadeia N-alquila da sílica modificada, após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano imobilizado. Na grande maioria os grupos polares são formados por átomos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com outras espécies, sendo que os átomos de nitrogênio e oxigênio desempenham muito bem esta função. As fases reversas contendo grupos polares do tipo amida (-NH-C(O)-R'), foram inicialmente sintetizadas há quinze anos atrás, através de um processo de modificação química em duas etapas. Na primeira, a sílica é modificada quimicamente com o aminoorganossilano monofuncional. Em uma segunda etapa da modificação, os grupos aminopropila, ligados à superfície da sílica, são acetilados através da reação com cloretos ácidos para formar o grupo funcional do tipo amida, inserido na cadeia N-alquila do ligante, como mostra a Figura 5.

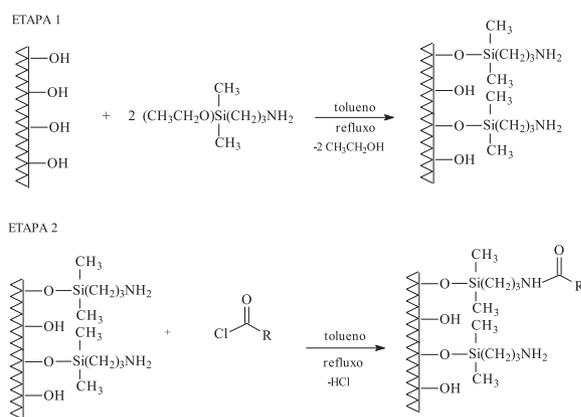


Figura 5. Esquema da preparação das fases reversas contendo grupos polares do tipo amida, em que o grupo R pode representar um grupo alquila ou arila, dependendo da escolha do respectivo cloreto ácido

O primeiro trabalho envolvendo a preparação deste novo tipo de sílica modificada foi o de Nomura *et al.*³², em 1987, onde foram utilizados os cloretos de benzila e propionila como reagentes para a segunda etapa de acetilação. Em um estudo sistemático, foi explorada a reatividade dos grupos aminopropila com esses reagentes, em função do tamanho do poro da sílica utilizada, na primeira etapa da modificação química. Entretanto, não foi explorada a utilização dessas sílicas modificadas como fase estacionária para cromatografia líquida.

Apenas em 1990, Ascah e Feibush³³, na época pesquisadores da Supelco, publicaram a separação de compostos básicos, incluindo a piridina e piridinas substituídas, utilizando uma nova fase estacionária que possuía grupos polares perto da superfície da sílica. Neste trabalho o tipo do grupo polar não foi revelado, porém, os resultados obtidos sugeriram que esses grupos polares minimizavam as interações indesejáveis com os silanóis residuais, permitindo a separação dos compostos básicos em pH em torno de 7,0, sem a adição de outras substâncias na fase móvel, para suprir as interações com os silanóis.

Esta fase ainda apresentava fracas interações dos grupos silanóis residuais com os analitos básicos, o que permitiu que essa nova subclasse de fases do tipo reversa continuasse sendo desenvolvida. No mesmo ano, a Supelco publicou o pedido de propriedade de patente dessas novas fases reversas, preparadas através do processo de

duas etapas, que se mostraram superiores às fases C₈ e C₁₈, por apresentarem boa eficiência e baixo alargamento de pico para compostos básicos³⁴.

Em 1991, Buszewski *et al.*³⁵ publicaram a síntese de novas fases estacionárias preparadas a partir da reação das sílicas do tipo aminopropila monofuncional e trifuncional com o cloreto derivado do ácido esteárico, utilizando o mesmo processo esquematizado na Figura 5. O reagente para a acetilação foi preparado a partir da reação do respectivo ácido graxo com cloreto de tionila (SOCl₂). As fases foram devidamente caracterizadas por ressonância magnética nuclear tanto de ²⁹Si como de ¹³C.

Em trabalho mais recente, Schmid *et al.*³⁶ conseguiram caracterizar essas novas fases reversas utilizando a ressonância magnética nuclear, sendo possível obter mais informações que comprovaram a formação do grupo polar (-NH-C(O)-R'), principalmente através do sinal em 160 ppm no espectro de RMN de ¹³C, referente à carbonila da função amida. Estudos envolvendo a seletividade das novas fases do tipo amida³⁷ foram realizados por Buszewski *et al.*³⁸ através da síntese de diferentes fases reversas do tipo amida com grupos terminais n-alquila, R', variando de C₅ a C₁₈³⁹.

Em um trabalho de 1996, Ascah *et al.*⁴⁰, pesquisadores da Supelco, apresentaram uma versão “melhorada” das fases do tipo amida disponíveis comercialmente, denominadas Supelco ABZPlus®. Neste trabalho foi dada grande ênfase na caracterização da referida fase por espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) e à avaliação do seu comportamento cromatográfico. Eles ressaltaram as vantagens destas fases do tipo amida em separar compostos polares e ionizáveis em comparação à fase sintetizada anteriormente³³ e as sílicas convencionais do tipo C₈ e C₁₈. Entretanto, sabe-se que este procedimento em duas etapas é ineficiente pois, na segunda etapa da reação, como mostrado na Figura 5, é difícil obter um rendimento de 100% na reação de acetilação, ficando grupos aminopropila sem reagir com o cloreto ácido. Como consequência, obtém-se uma fase mista, com grupos aminopropila remanescentes, os quais podem estar presentes entre os grupos do tipo amida.

A presença destes grupos remanescentes na superfície da sílica modificada, às vezes, pode ser benéfica para algumas separações, pois o grupo -NH₂ também tem a propriedade de reduzir os efeitos indesejáveis dos silanóis residuais presentes na superfície da sílica. Mas, na maioria dos casos, esses grupos remanescentes do tipo amina podem causar fortes interações. Conseqüentemente, o alargamento ou até mesmo a adsorção irreversível pode ocorrer durante a separação cromatográfica, principalmente em meio ácido, onde o grupo -NH₂ pode estar protonado, propiciando interações através da troca iônica com os compostos ácidos, os quais podem estar parcialmente dissociados, dependendo do seu pK_a e do pH da fase móvel.

Como alternativa, os pesquisadores da Waters Corporation publicaram em 1995 a síntese de uma nova fase reversa, baseada na modificação da superfície da sílica em uma única etapa, diferente da metodologia empregada na síntese das fases reversas contendo grupos polares do tipo amida⁴¹. Inicialmente, foi preparado o clorosilano, já contendo o grupo funcional embutido, sendo neste caso do tipo carbamato (-O-C(O)-NH-R), com características semelhantes aos do tipo amida. A rota de síntese, baseada em uma série de reações, é mostrada na Figura 6 e foi patenteada⁴², em 1994. A Waters comercializa essas fases estacionárias denominadas SymmetryShield®.

O grupo R depende da escolha prévia da amina na etapa de síntese da olefina. Na primeira etapa é sintetizada uma olefina bifuncional, o clorofornato de alila, que reage com uma amina alifática, podendo ser a octadecilamina, por exemplo, para formar outra olefina, contendo um grupo funcional do tipo carbamato. Em seguida, esse intermediário sofre uma reação de hidrossililação com o reagente clorodimetilsilano na presença do catalisador, que é um

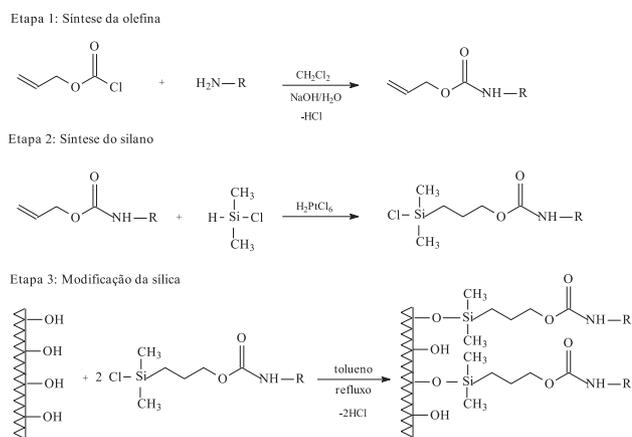


Figura 6. Representação da síntese das fases estacionárias do tipo reversa, contendo grupos polares do tipo carbamato, desenvolvida pelos pesquisadores da Waters Corporation

ácido derivado da platina (H_2PtCl_6). A modificação da superfície da sílica é feita através da reação do grupo cloro do agente sililante com os silanóis da sílica, produzindo uma superfície quimicamente homogênea⁴³.

Os materiais preparados seguindo esta rota de síntese são considerados como a segunda geração das fases estacionárias reversas, contendo grupos polares embutidos na cadeia n-alquila. A modificação da superfície da sílica com o organossilano já contendo o grupo funcional é bastante vantajosa quando comparada com o método inicialmente desenvolvido, pois produz uma superfície com um único grupo funcional, ao contrário do observado quando se utiliza o método em duas etapas, em que a modificação da sílica ocorre antes da reação química com os grupos funcionais do organossilano⁴⁴.

Além da técnica de preparar fases estacionárias reversas, contendo grupos polares embutidos, pode-se também empregar as fases estericamente protegidas⁴⁵. Estas são assim denominadas por apresentarem, além dos grupos polares embutidos, grupos volumosos isopropila ou isobutila ligados diretamente ao átomo de silício, como mostra o exemplo da Figura 7.

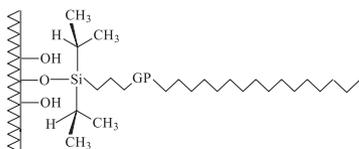


Figura 7. Representação esquemática de uma fase estacionária combinando duas tecnologias distintas: a utilização dos grupos isopropila ligados diretamente ao átomo de silício, juntamente com grupos polares (GP) na cadeia n-alquila

A rota de síntese destas fases estericamente protegidas, contendo grupos polares do tipo amida, não foi revelada, mas acredita-se que seja por um processo de duas etapas similar ao mostrado na Figura 5. Entretanto, algumas publicações mostraram que estas fases são menos estáveis em fases móveis com pH superior a 7, em comparação com as fases monofuncionais, preparadas com os monoclorossilanos e, também, em relação às fases poliméricas preparadas com agentes sililantes trifuncionais como, por exemplo, o octadeciltriclorossilano ou octadeciltrimetoxissilano⁴⁶.

O motivo da baixa estabilidade está relacionado com o menor grau de recobrimento da superfície da sílica, quando se utilizam os silanos monofuncionais com os grupos isopropila ou isobutila. A

presença destes grupos volumosos deve dificultar a reação dos grupos reativos do silano com os silanóis da superfície da sílica.

Essas fases estacionárias reversas, que combinam em um único material duas propriedades distintas, já se encontram disponíveis comercialmente. Um exemplo é a coluna ZORBAX Bonus-RP[®] da Agilent Technologies, recheada com uma fase do tipo reversa com grupos polares do tipo amida inseridos na cadeia n-alquila de quatorze átomos de carbono, além de grupos isopropila ligados diretamente ao átomo de silício⁴⁵. Essas fases são preparadas em um processo de duas etapas.

Seguindo essas novas tendências, em nossos laboratórios foram preparadas fases estacionárias reversas, contendo grupos polares do tipo uréia inseridos na cadeia n-alquila do agente sililante⁴⁷. Os resultados obtidos foram satisfatórios, indicando que os grupos do tipo uréia também desempenham muito bem a função de minimizar as interações indesejadas com os silanóis residuais na análise de compostos básicos⁴⁸⁻⁵⁰.

Ainda não se sabe exatamente como essas fases, contendo os grupos polares inseridos, conseguem minimizar as interações dos grupos silanóis com os compostos básicos. Os grupos polares, que podem ser do tipo amida, carbamato ou uréia, podem interagir com os grupos silanóis da sílica através da ligação de hidrogênio, como mostrado na Figura 8a. Dessa forma, estes silanóis estão menos disponíveis para interagirem com os compostos básicos durante a separação cromatográfica, diminuindo o alargamento e, conseqüentemente, a assimetria⁴⁴.

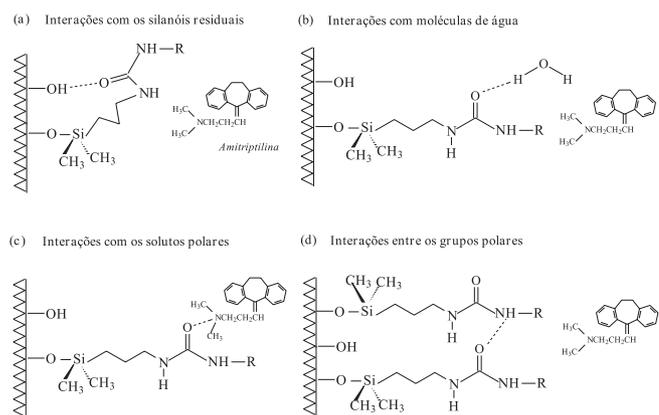


Figura 8. Prováveis interações durante a separação cromatográfica utilizando uma fase com o grupo polar do tipo uréia. (a) o grupo polar compete com o analito para interagir com o silanol residual, (b) o grupo polar aumenta a concentração de água na camada de hidratação, (c) a molécula do analito pode interagir com o grupo polar e (d) as interações entre os grupos polares de cadeias adjacentes

Outro mecanismo proposto seria que os grupos polares, inseridos na cadeia carbônica, podem interagir também com moléculas de água da fase móvel, como mostra a Figura 8b, formando uma suposta camada ou barreira de moléculas de água. A formação desta camada diminuiria a hidrofobicidade da fase estacionária ao redor da superfície. Como conseqüência, o acesso dos compostos básicos aos grupos silanóis fica dificultado, deixando esses grupos inacessíveis para a interação⁴⁴.

Outra possibilidade seria aquela em que o analito pode interagir preferencialmente com o grupo polar da fase estacionária, ao invés de interagir com os silanóis residuais, evitando as interações indesejáveis, como mostra a Figura 8c⁴⁴.

As possíveis interações entre os grupos polares de cadeias adjacentes também são esperadas através das ligações de hidrogênio, como

está esquematizado na Figura 8d. Essas interações também podem bloquear o acesso aos silanóis residuais, diminuindo o número de interações indesejadas com os analitos durante a separação cromatográfica.

Esses mecanismos foram propostos para explicar porque essas fases têm a propriedade de minimizar as interações indesejáveis entre os grupos silanóis e os analitos básicos. Algumas evidências mostraram que a superfície da sílica tem uma maior concentração de água, devido às suas ligações de hidrogênio com os respectivos grupos polares, ficando próximas à superfície do suporte cromatográfico.

Espera-se a formação de uma barreira “virtual” de moléculas de água, a qual impede, de certa maneira, a interação dos analitos básicos com os silanóis residuais. Outra evidência prática é que com essas fases polares é possível realizar algumas separações cromatográficas utilizando, por exemplo, uma fase móvel com 100% de água. Nas fases clássicas isto não é possível, devido ao colapso que ocorre com as cadeias hidrofóbicas imobilizadas na superfície da sílica, alterando consideravelmente a retenção dos analitos⁵¹, como mostram os diagramas da Figura 9.

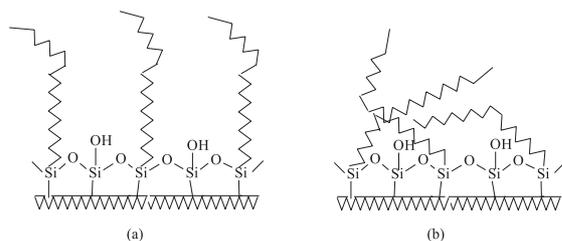


Figura 9. Diagramas das possíveis conformações das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C₁₈ imobilizadas na superfície da sílica: (a) estendida, quando solvatada por uma fase móvel adequada e (b) o colapso das cadeias orgânicas na presença de uma fase móvel composta por quase 100% de água

Por outro lado, a presença dessa barreira de moléculas de água parece contribuir para uma maior dissolução do suporte de sílica, quando comparada com as fases clássicas C₈ e C₁₈. Em um estudo realizado para avaliar a estabilidade química de diferentes fases estacionárias, verificou-se que uma fase reversa do tipo amida da Supelco (ABzPlus[®]) mostrou menor estabilidade que as fases C₈ e C₁₈ sem grupos polares embutidos, nas condições experimentais empregadas no teste. Os autores sugeriram que a menor estabilidade poderia estar relacionada com a maior hidratação da superfície da sílica, deixando-a mais susceptível à hidrólise⁴⁶. No teste de estabilidade realizado em nossos laboratórios, empregando uma fase móvel tamponada em pH 7 com tampão fosfato, a fase do tipo C₁₈ contendo grupos polares do tipo uréia mostrou ser bastante estável até a passagem de 20000 volumes de coluna da referida fase móvel⁴⁹.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram descritas algumas fases estacionárias reversas à base de sílica, que foram lançadas recentemente no mercado. As novas fases apresentam algumas vantagens em relação às fases convencionais do tipo C₈ e C₁₈. As fases estericamente protegidas apresentam melhor estabilidade química em separações que empregam fases móveis agressivas, em pH menor que 7. Já as fases reversas bidentadas apresentam melhor desempenho em separações que envolvam o uso de uma fase móvel com pH superior a 8. As fases monolíticas são bastante interessantes, pois permitem análises rápidas, empregando altas vazões de fase móvel sem haver perda de resolução e/ou aumento de pressão, comumente observado nas colu-

nas recheadas com sílica particulada. As fases reversas com grupos polares embutidos são úteis na separação de compostos básicos e/ou ionizáveis, devido aos grupos polares que minimizam as interações indesejáveis destes compostos com os grupos silanóis residuais.

REFERÊNCIAS

1. Neue, U. D.; *HPLC Columns, Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH: New York, 1997.
2. Unger, K. K.; *Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography*, 2nd ed., Elsevier: New York, 1979.
3. Majors, R. E.; *LC-GC* **2000**, *18*, 586.
4. Rozing, G.; *LC-GC Europe* **2003**, *16*, 14.
5. Dolan, J. W.; *LC-GC* **1998**, *16*, 350.
6. Nawrocki, J.; *J. Chromatogr.* **1997**, *779*, 29.
7. Majors, R. E.; *LC-GC* **2000**, *18*, 1214.
8. Kirkland, J. J.; DeStefano, J. J.; *J. Chromatogr. Sci.* **1970**, *8*, 309.
9. Schomburg, G.; Köhler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U.; *Chromatographia* **1984**, *18*, 265.
10. Anazawa, T. A.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*, 645.
11. Jardim, I. C. S. F.; Collins, K. E.; Anazawa, T. A.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 299.
12. Bottoli, C. B. G.; Chaudhry, Z. F.; Fonseca, D. A.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *948*, 121.
13. Li, J.; Reeder, D. H.; McCormick, A. V.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *791*, 45.
14. Lopes, N. P.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 77.
15. Forgács, E.; Cserhádi, T.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *797*, 33.
16. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 616.
17. Fisk, R. P.; Walter, T. H.; Zhiping, J.; Jiang, Z.; *US pat. 33,931-A1* **2001**. (CA 137:41037).
18. Cheng, Y. F.; Walter, T. H.; Lu, Z.; Iraneta P.; Alden B. A.; Genderau, C.; Neue, U. D.; Grassi, J. M.; Carmody, J. L.; O'Gara, J. E.; Fisk, R. P.; *LC-GC* **2000**, *18*, 1162.
19. Mazzeo, J.; Wagoski, D.; Grumbach, E.; Tran, K.; Neue, U. D.; *26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2002*, Montreal, Canadá, 2002.
20. Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; Farlee, R. D.; *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2.
21. Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *US pat. 4,705,725-A* **1987**. (CA 108:146734).
22. Neue, U. D.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 101.
23. Claessens, H. A.; van Straten, M. A.; Kirkland, J. J.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 259.
24. Kirkland, J. J.; Adams Jr., J. B.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4344.
25. Kirkland, J. J.; Adams Jr., J. B.; *US. pat. 5,869,724-A* **1999**. (CA 130:162560).
26. Kirkland, J. J.; Adams Jr., J. B.; *US. pat. 5,948,531-A* **1999**. (CA 131:251892).
27. Nakanishi, K.; Nagakane, T.; Soga, N.; *J. Porous Mat.* **1998**, *5*, 103.
28. Nakanishi, K.; Soga, N.; Minakuchi, H.; *JP pat. 101-82260-A* **1998**.
29. Cabrera, K.; Wieland, G.; Lubda, D.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Minakuchi, H.; Unger, K. K.; *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 50.
30. Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Jinnai, H.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 53.
31. Przybyciel, M.; Majors, R. E.; *LC-GC* **2002**, *20*, 584.
32. Nomura, A.; Yamada, J.; Tsunoda, K.; *Anal. Sci.* **1987**, *3*, 209.
33. Ascah, T. L.; Feibush, B.; *J. Chromatogr.* **1990**, *506*, 357.
34. Feibush, B.; *US pat. 5,137,627-A* **1990**. (CA 114:74444).
35. Buszewski, B.; Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E.; *J. Chromatogr.* **1991**, *552*, 415.
36. Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 333.
37. Buszewski, B.; Jaroniec, M.; Gilpin, R. K.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *668*, 293.
38. Buszewski, B.; Jaroniec, M.; Gilpin, R. K.; Kasturi, P.; Gangoda, M. E.; *Chromatographia* **1994**, *39*, 155.
39. Czajkowska, T.; Hrabovsky, I.; Buszewski, B.; Jaroniec, M.; Gilpin, R. K.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 217.
40. Ascah, T. L.; Kallury, K. M. L.; Szafranski, C. A.; Corman, S. D.; Lui, F.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, *19*, 3049.
41. O'Gara, J. E.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; Petersen, J. S.; Niederlander, C. L.; Neue, U. D.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3809.

42. Neue, U. D.; Niederlander, C. L.; Petersen, J. S.; *US pat. 5,374,755-A* **1994**. (CA 121:270868).
43. O'Gara, J. E.; Walsh, D. P.; Alden, B. A.; Casellini, P.; Walter, T. H.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2992.
44. O'Gara, J. E.; Walsh, D. P.; Phoebe Jr., C. H.; Alden, B. A.; Bouvier, E. S. P.; Iraneta, P. C.; Capparella, M.; Walter, T. H.; *LC-GC* **2001**, *19*, 632.
45. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; Martosella, J. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Vasta-Russell, J.; Adams Jr, B. A.; *LC-GC* **1999**, *17*, 634.
46. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *762*, 97.
47. Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *913*, 65.
48. Silva, C. R.; Bachmann, S.; Schefer, R. R.; Albert, K.; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *948*, 85.
49. Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 139.
50. Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 127.
51. Morrison, R. D.; Dolan, W.; *LC-GC* **2000**, *18*, 936.