JULIANO ROLDAN FONSECA

Avaliação dos processos de pré-tratamento da superfície da sílica fundida no preparo de colunas capilares inertes para cromatografia gasosa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2009

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria,
o homem que obtém entendimento, pois a
sabedoria é mais proveitosa do que a prata e
rende mais do que o ouro.
É mais preciosa do que rubis;
Nada do que você possa desejar se compara a
ela.”

(Provérbios 3: 13-15)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar, ao meu Pai e minha Mãe que tanto se esforçaram e trabalharam duro para que eu pudesse ter uma educação de qualidade, muitas vezes deixando suas próprias vontades de lado para me ver crescer. Cheguei até aqui porque eles foram meus primeiros professores me ensinando os verdadeiros valores da vida.

Dedico também a toda minha família; irmão, tios e avós, que sempre torceram pelo meu sucesso e são a base da minha vida e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e sabedoria que proporcionam meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço ao Professor Fernando M. Lanças pela orientação, confiança e compreensão durante o decorrer deste trabalho.

Ao Instituto Internacional de Cromatografia pela bolsa concedida.

Aos funcionários do IIC, em especial ao Luis e ao Esmeraldo por todo conhecimento técnico transmitido e pela grande amizade formada.

A todos os amigos do Grupo de Cromatografia que de uma forma ou outra auxiliaram no meu trabalho e dividiram momentos agradáveis de convivência.

À Odete por todo seu apoio na secretaria.

A todos os amigos que fiz em São Carlos desde a graduação. Eles representaram uma grande família para mim durante esta maravilhosa etapa da minha vida.

Aos amigos de São Paulo, Robson, Denise e Família, que mesmo distantes, souberam manter viva a verdadeira amizade e acompanharam os meus passos.

À minha família por todo apoio antes e durante meu estágio na Alemanha.

À CPG do Instituto de Química de São Carlos, onde encontrei o apoio acadêmico necessário para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLA	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cromatografia Gasosa	2
1.2. Desenvolvimento das colunas para CG	4
1.2.1 Tipos de colunas	5
1.3. A Sílica Fundida	7
1.4. Processos de Tratamento da Superfície	10
1.4.1. Lixiviação	10
1.4.2. Lavagem	11
1.4.3. Desidratação	12
1.4.4. Persililação	12
1.4.5. Recobrimento	15
1.4.6. Imobilização e ligação cruzada	20
1.4.7. Teste de Grob	21
2. OBJETIVOS	24
3. EXPERIMENTAL	25
3.1. Materiais e equipamentos utilizados	25
3.2. Tubos	26

3.3.	Sistemas de preenchimento e recobrimento do tubo	26
3.4.	Processo de preparo das colunas capilares.....	28
3.4.1.	<i>Etapa da Lixiviação</i>	28
3.4.2.	<i>Etapa da Lavagem.....</i>	28
3.4.3.	<i>Etapa da Desidratação</i>	28
3.4.4.	<i>Etapa da Persililação.....</i>	29
3.4.5.	<i>Etapa do Recobrimento</i>	29
3.4.6.	<i>Cross-linking</i>	30
3.4.7.	<i>Condicionamento das colunas preparadas</i>	30
3.5.	Teste para as colunas preparadas.....	31
3.6.	Condições cromatográficas	31
4.	RESULTADOS.....	32
4.1.	<i>Estudo da influência da lixiviação</i>	32
4.2.	<i>Avaliação da reação de silanização</i>	37
4.3.	<i>Avaliação da reprodutibilidade do recobrimento</i>	44
4.4.	<i>O uso de filmes finos de PEG</i>	48
4.4.1.	<i>Ensaaios com a fase OV-73.....</i>	50
4.4.2.	<i>Ensaaios com a fase OV-17.....</i>	54
5.	CONCLUSÕES	58
5.1.	<i>Sugestões para trabalhos futuros.....</i>	59
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de um cromatógrafo a gás.....	3
Figura 2: Tipos de coluna capilares.....	6
Figura 3: Composição do polímero da poliimida.....	7
Figura 4: Superfície química da sílica.....	9
Figura 5: Reação entre os grupos silanol e o reagente HMDS.....	13
Figura 6: Estrutura química de alguns agentes silanizantes.....	14
Figura 7: Recobrimento estático em uma coluna capilar. 1) solução de fase estacionária; 2) filme da fase estacionária; 3) menisco formado pela evaporação do solvente.....	16
Figura 8: Estrutura química do PDMS.....	18
Figura 9: Estrutura do Carbowax.....	19
Figura 10: Sistema de preenchimento do capilar. 1) cilindro de gás para pressurização, 2) controlador de baixa pressão, 3) frasco com a solução de interesse, 4) frasco de pressurização, 5) coluna capilar.....	27

Figura 11: Sistema de recobrimento do tubo. 1) garrafa térmica contendo N₂ líquido, 2) aquário com banho de água termostatizado, 3) coluna capilar enrolada em um aro de metal, 4) interface para a bomba, 5) bomba de vácuo.....27

Figura 12: Cromatograma da mistura teste analisada em uma coluna lixiviada com HCl 2% e recoberta com filme 0,25 µm de fase OV-73. 1- octanol, 2- co-eluição entre o undecano e dimetilanilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.....33

Figura 13: Cromatograma da mistura teste analisada em uma coluna lixiviada com solução 5% de HCl e recoberta com filme 0,25 µm de fase OV-73.....33

Figura 14: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna lixiviada com solução HCl 2% , lavada e secada apenas com a passagem de ar.....35

Figura 15: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas do pré-tratamento do tubo, exceto a lixiviação.....35

Figura 16: Cromatograma da mistura-teste analisada em uma coluna que não sofreu a etapa da lixiviação, apenas silanização com HMDS.....36

Figura 17: Comparação entre uma coluna danificada pela alta temperatura (coloração escura) e outra com características normais (coloração clara).....38

Figura 18: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas do pré-tratamento do tubo. Silanização com HMDS a 350° C por 6 horas.....40

Figura 19: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas de pré-tratamento. Silanização com DPTMDS a 350° C por 6 horas.....40

Figura 20: Coluna que sofreu silanização com uma solução de DPTMDS em Pentano 1:5.....42

- Figura 21:** Capilar 1 silanizado com TPDMS e recoberto com fase OV-73.....42
- Figura 22:** Capilar 2 silanizado com TPDMS e recoberto com fase OV-73.....43
- Figura 23:** Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 1.....45
- Figura 24:** Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 2.....46
- Figura 25:** Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 3.....46
- Figura 26:** Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 4.....47
- Figura 27:** Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 5.....47
- Figura 28:** Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,01 µm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- octanol, 5- dimetilfenol, 6- dimetilanilina.....48
- Figura 29:** Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,05 µm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- octanol, 5- dimetilanilina, 6- dimetilfenol.....49
- Figura 30:** Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,10 µm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- co-eluição entre octanol e dimetilanilina, 5- dimetilfenol.....49

- Figura 31:** Coluna com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG. Análise da mistura-teste. 1- octanol, 2- co-eluição entre undecano e dimetilanilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.....51
- Figura 32:** Ciclos de condicionamento em coluna com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre o filme de 0,05 μm de PEG.....52
- Figura 33:** Análise da mistura-teste em coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG; após ciclos de condicionamento. 1- octanol, 2- co-eluição entre undecano e dimetilanilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.....53
- Figura 34:** Análise da mistura-teste em coluna apenas recoberta com um filme de 0,05 μm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- octanol, 5- dimetilanilina, 6- dimetilfenol.....54
- Figura 35:** Análise da mistura-teste em coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG. 1- octanol, 2- undecano, 3- dimetilanilina, 4- dimetilfenol, 5- hexadecano, 6- octadecano.....55
- Figura 36:** Ciclos de condicionamento para a coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG.....56
- Figura 37:** Análise da mistura-teste após ciclos de condicionamento. Coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG. 1- octanol, 2- undecano, 3- dimetilanilina, 4- dimetilfenol, 5- hexadecano, 6- octadecano.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de algumas fases estacionárias fabricadas a partir do polimetilsiloxano.....18

Tabela 2 : Comparação do tempo de retenção para uma coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG.....53

Tabela 3: Tempo de retenção para uma coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-17 sobre um filme de 0,05 μm de PEG.....57

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLA

CG	Cromatografia Gasosa
Micro-LC	<i>Micro-Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida miniaturizada
WCOT	<i>Wall Coated Open Tubular</i> - Coluna capilar aberta com parede recoberta
SCOT	<i>Support Coated Open Tubular</i> - Coluna capilar aberta com suporte recoberto
PLOT	<i>Porous Layer Open Tubular</i> – Coluna capilar aberta com camada porosa
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> – Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
.	
HMDS	Hexametildisilazano
TPDMDS	Tetrafenildimetildisilazano
DPTMDS	Difeniltetrametildisilazano
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PEG	Polietileno glicol

ATB	Azo-terc-butano
ATO	Azo-terc-octano
OV	Ohio Valley
FID	Detector por ionização de chama

LISTA DE SÍMBOLOS

m	metro
mm	milímetro
μm	micrômetro
°C	graus Celsius
%	porcentagem
ppm	partes por milhão
mol L⁻¹	mol por litro
mL	mililitro
μL	microlitro
cm/s	centrímetros por segundo
°C/min	graus Celsius por minuto
g	gramas
t_R	tempo de retenção

RESUMO

O controle da superfície química em colunas capilares abertas é de fundamental importância para atingir um alto desempenho na análise cromatográfica, sendo muito estudada ao longo das décadas de 70 e 80, mas tendo pouco destaque nos últimos anos por parte dos pesquisadores.

A atividade da superfície de uma coluna capilar é causada por grupos silanol (Si-OH) e impurezas como metais, por exemplo. A presença destes grupos silanol faz com que alguns compostos sofram adsorção, principalmente pela formação de pontes de hidrogênio, originando picos com longas caudas no cromatograma.

Por isso, a eliminação dos sítios ativos faz-se necessária quando uma amostra apresenta interação com a superfície da coluna. Esta desativação pode ser feita por meio de agentes silanizantes que reagem com os grupos hidroxila.

Visto que a maioria dos artigos publicados sobre este assunto envolve colunas de vidro, o presente trabalho estudou os efeitos de cada fase do pré-tratamento de tubos aplicado para as colunas atuais de sílica fundida, verificando os agentes silanizantes HMDS, DPTMDS e TPDMS que seriam mais adequados para suportar as fases estacionárias OV-73 e OV-17. Também se avaliou o uso de filmes finos de 0,01 , 0,05 e 0,10 μm de polietileno glicol (PEG) como alternativa para a desativação da parede interna do capilar, o qual mostrou resultados satisfatórios de estabilidade e inatividade.

ABSTRACT

The control of the inner surface in open tubular capillary columns has fundamental importance to reach a high performance in gas chromatography analysis. It was very studied during 1970's and 1980's, but has not interested the researches along last years, not excluding also, the possibility of commercial secrets regarding column preparation.

The activity on the surface of capillary column is mainly caused by silanol groups (Si-OH) and impurities such as metal ions and water. These groups favours reversible and irreversible adsorption of polar compounds, which results in tailed peak shapes and incomplete elution from the column.

Therefore, the elimination of the active sites is necessary. The deactivation procedures are based on blocking of silanol groups by means of chemical reaction.

This present work studied the effects of the surface pretreatment steps applied to fused silica capillary columns. Some silylating agents such as HMDS, DPTMDS and TPDMDs were valued. The coating behavior using OV-73 and OV-17 stationary phases was studied too.

Film thickness of 0,01 , 0,05 and 0,10 μm of poly(ethylene glycol) (PEG) was applied as alternative procedure, showing good stability and column deactivation.

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação onde os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases: uma das fases constitui uma superfície denominada fase estacionária; e a outra se move através da primeira, chamada fase móvel.

Em 1903, TSWETT utilizou os termos “cromatografia” e “cromatograma” em dois trabalhos que descrevem a separação dos componentes de extrato de folhas em uma coluna de vidro, recheada com vários sólidos, usando éter de petróleo como eluente. Sendo assim, a descoberta da cromatografia é atribuída a este pesquisador ^[1].

Apesar destas experiências, foi só em 1930 que Kuhn e Lederer aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, utilizando carbonato de cálcio pulverizado como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. Considerou-se este período como o início da cromatografia moderna, ainda que realizada em colunas de vidro preparativa, recheadas com suporte sólido, nas quais as amostras eram submetidas juntamente com o solvente ^[1].

O uso da fase móvel líquida foi a única opção durante muitos anos, até que em 1941 Martin e Synge previram que a fase móvel não precisava ser um líquido, mas poderia ser também um vapor. Descreveram a partição líquido-líquido e aplicaram o conceito de pratos teóricos à cromatografia. Este trabalho antecipou o

surgimento da cromatografia gasosa e da cromatografia líquida de alta eficiência, a qual renderia a estes outros o Prêmio Nobel de 1952^[1].

Assim, a cromatografia tornou-se uma ferramenta poderosa, com aplicações multidisciplinares, que permite separar, quantificar e identificar substâncias químicas em misturas complexas.

1.1. Cromatografia Gasosa

Na cromatografia gasosa a amostra é vaporizada e introduzida no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de gás inerte que atua como fase móvel, cuja função é apenas arrastar os analitos através da coluna sem interagir com os mesmos. Os compostos são eluídos da coluna cromatográfica e passam pelo detector sendo registrados em seguida como curvas gaussianas (**Figura 1**).

A cromatografia gás-sólido está baseada em uma fase estacionária sólida de grande área superficial, normalmente carvão vegetal, sílica-gel ou zeólitas sintéticas, na qual a separação dos analitos é consequência de adsorção física. Ela tem aplicação limitada devido à retenção de moléculas polares ou ativas, e geralmente, é empregada na análise de gases como nitrogênio, oxigênio, monóxido de carbono entre outros^[1,2].

Na cromatografia gás-líquido, o processo de separação se dá por partição do analito entre a fase móvel e uma fase líquida imobilizada em um suporte sólido.

Figura 1: Esquema geral de um cromatógrafo a gás.

Estas técnicas desenvolveram-se rapidamente a partir da década de 1950. Em 1955 surgiu no mercado o primeiro equipamento comercial para este fim. Desde então, houve um crescimento extraordinário de suas aplicações, principalmente após a introdução dos computadores que permitiram o controle das condições experimentais facilitando o auto-processamento de dados ^[2].

A cromatografia gasosa é uma técnica com um alto poder de resolução, rapidez, e geralmente está acoplada a detectores muito sensíveis. Trata-se hoje de uma técnica indispensável à pesquisa, controle de qualidade na indústria farmacêutica ou alimentícia, monitoramento de poluentes no meio ambiente, entre

outras aplicações. Sua rápida expansão é resultado dos esforços de muitos pesquisadores no desenvolvimento das colunas capilares de alto desempenho^[3].

1.2. Desenvolvimento das colunas para CG

A coluna cromatográfica é considerada a parte mais importante de todo sistema uma vez que neste componente a separação ocorrerá. As primeiras colunas analíticas eram feitas de metal (geralmente aço inoxidável) com dimensões de 1 a 4 mm de diâmetro interno e 1 a 3 metros de comprimento, possibilitando a injeção de uma maior quantidade de amostra. As colunas capilares foram introduzidas em 1958 por Golay. Logo após, em 1959 Desty trabalhando em uma empresa de petróleo britânica, produziu a primeira coluna capilar de vidro utilizando um filme de esqualeno na superfície interna como fase estacionária. Contudo sua coluna perdia totalmente suas características após algumas análises o que o fez desistir do vidro como material para fabricação das colunas^[2,3].

Grob continuou estudando o problema e em 1964 produziu colunas capilares de vidro com recobrimento interno carbonizado por meio da pirólise do CH_2Cl_2 , possibilitando a deposição eficiente de filmes de fase estacionária. Subsidiado por uma empresa de cigarros suíça, Grob aplicou suas colunas na análise de fumaça de cigarro separando mais de 300 compostos. O sucesso da análise levou-o também ao primeiro acoplamento das colunas capilares a um espectrômetro de massas^[3].

Os trabalhos de Grob na década de 1960 e 1970 fizeram com que houvesse uma rápida transição para as colunas de vidro. Várias máquinas nos laboratórios produziam colunas capilares de vidro com vários diâmetros baseadas no sistema descrito por Desty e colaboradores^[3,4].

Em 1979, um novo tipo de coluna foi introduzido. Com o desenvolvimento da tecnologia da fibra óptica, a sílica fundida tornou-se o material de escolha para as colunas capilares. O advento dos capilares de sílica fundida para cromatografia gasosa foi a maior avanço tecnológico desenvolvido no campo das ciências de separação no século XX. A revolução não ocorreu somente para esta técnica como também, posteriormente, os capilares foram aplicados na eletroforese capilar e na cromatografia líquida miniaturizada (micro-LC)^[5]

1.2.1 Tipos de colunas

As colunas capilares geralmente possuem dimensões de 0,10 a 0,53 mm de diâmetro interno e de 10 a 100 m de comprimento.

Existem vários tipos de colunas capilares para cromatografia gasosa como mostrado na **Figura 2**. As colunas empacotadas possuem seu interior recheado com partículas do suporte sólido, recobertos ou não com um filme de fase líquida. Nas colunas do tipo WCOT (*Wall Coated Open Tubular*), a fase estacionária é depositada na parede interna do tubo, na forma de um filme, deixando a parte central oca, sendo adequadas à maioria das aplicações. A coluna do tipo SCOT (*Support Coated Open Tubular*) possui a parede interna do capilar recoberta com um suporte sólido onde é depositado um filme de fase líquida; de uma maneira

geral são menos eficientes do que as do tipo WCOT. As colunas denominadas PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) possuem em sua parede interna apenas partículas de um sólido adsorvente ^[1,2,6].

As colunas capilares de sílica fundida recebem um recobrimento externo de poliimida (**Figura 3**) para aumentar sua resistência mecânica e protegê-las da exposição atmosférica. Uma pequena ranhura de 1 μm na sílica pode causar sua quebra; por isso, o recobrimento externo de poliimida na sílica se faz tão importante ^[5].

Figura 2: Tipos de coluna capilares.

Figura 3: Composição do polímero da poliimida

1.3. A Sílica Fundida

Para os fabricantes de tubos de sílica-fundida, o uso desta em ciências de separação representa um insignificante mercado quando comparado ao de telecomunicações. Todas as novidades e esforços para melhorar a pureza da sílica são direcionados ao desenvolvimento de fibra óptica. Por sorte, os cromatografistas têm acesso a todos estes materiais.

Os primeiros capilares de sílica-fundida possuíam uma alta concentração de água, em torno de 400-600 ppm, que permanecia após a obtenção do produto de hidrólise SiCl_4 , no qual restavam também aproximadamente 125 ppm de cloreto. A água como contaminante limitava a eficiência na transmissão da luz na região do infravermelho usada para a telecomunicação. Consequentemente, os produtores se esforçaram para reduzir estes índices de impurezas e hoje a concentração de água nos capilares de sílica não ultrapassa 0,2 ppm. Por outro

lado, a concentração de cloretos aumenta se o gás cloro for usado para secar a sílica; daí a necessidade de se usar atmosferas inertes para este fim ^[5].

A sílica-fundida permite o preparo de colunas com paredes finas, as quais exibem ótima flexibilidade. Esse material pode ser descrito como um vidro mais simples, ou um “vidro ideal” por não possuir qualquer aditivo usado para modificar suas propriedades físicas ou químicas. Esta ausência de impurezas confere propriedades cromatográficas muito melhores em relação aos outros materiais usados na preparação de tubos até então ^[5,6].

A síntese da sílica fundida é baseada na hidrólise do SiCl₄ de acordo com a equação 1:

Na estrutura da sílica, os átomos de silício estão coordenados tetraedricamente com quatro átomos de oxigênio. No entanto, a presença de grupos hidroxila foi identificada em diversas posições na superfície da sílica (**Figura 4**). Hoje em dia, a concentração destes grupos é muito baixa devido à alta temperatura usada no preparo; porém variáveis incontroláveis como, por exemplo, a umidade do ar no dia da fabricação do material ou gases ácidos de nitrogênio podem hidrolisar um grupo siloxano a silanol ^[5].

A atividade das colunas causada pelos grupos silanol (Si-OH), presentes na superfície do capilar, prejudica a eficiência da separação ao adsorver alguns compostos, tanto para o vidro como para a sílica fundida, principalmente quando recobertas com filmes muito finos de fase estacionária.

Figura 4: Superfície química da sílica.

Surgiram então, vários estudos numa tentativa quase que desesperada para desativar as colunas capilares de cromatografia gasosa buscando eliminar os sítios ativos.

O controle da superfície química em colunas capilares buscando o alto desempenho na separação, foi durante muito tempo o foco de pesquisadores da área, sendo muito estudada ao longo das décadas de 1970 e 1980, mas tendo pouco destaque nos últimos anos. Provavelmente, o rápido crescimento das indústrias de instrumentação analítica e seus segredos comerciais envolvidos no que se referem à preparação de colunas, diminuíram o número de artigos publicados sobre o assunto e, conseqüentemente, o interesse no meio acadêmico [7].

Os processos de tratamento de superfície têm certa controvérsia e confusão ao longo da literatura, principalmente porque a maioria os descreve para

as colunas de vidro ao invés das colunas atuais de sílica fundida, não havendo um padrão bem definido a ser seguido^[7].

1.4. Processos de Tratamento da Superfície

As propriedades da superfície interna da coluna pré-tratada determinam o sucesso ou não de sua aplicação prática. Adsorção reversível e irreversível de analitos polares, as quais são possíveis de perceber no cromatograma por pela presença de caudas nos picos, além da eluição incompleta, são fatores agravantes na busca de uma coluna capilar de boa qualidade^[8].

A preparação de uma coluna capilar WCOT inerte envolve várias etapas as quais não possuem um entendimento completo e devem ser estudadas empiricamente. Diferentes parâmetros produziram resultados semelhantes na literatura, o qual é provavelmente o motivo das inúmeras recomendações publicadas no que se refere à preparação de colunas^[8].

As etapas de preparo de uma coluna capilar são descritas a seguir.

1.4.1. Lixiviação

A função da lixiviação é, primeiro promover a deionização da superfície pela substituição de íons metálicos por íons H^+ e segundo, aumentar a densidade de grupos hidroxila para servir como possíveis pontos de modificação. Em princípio, a lixiviação pode ser ácida ou básica, sendo necessário manter uma superfície lisa. Contudo, o tratamento básico tende a corroer e produzir poros se

não for bem controlado. A profundidade da lixiviação depende da temperatura do processo, concentração da solução e do tempo de duração ^[9,10].

A lixiviação dinâmica consiste em passar um fluxo constante da solução de lixiviação pelo capilar por um longo período de tempo, enquanto que a lixiviação estática sugere o preenchimento de apenas 25% do volume do capilar com a solução e o aquecimento do mesmo após fechar suas saídas. Grob ^[10] descreve que a lixiviação estática produz melhores resultados e que nenhum tratamento mais sofisticado deve ser escolhido antes de comparar com o simples procedimento estático. Ele sugere também o uso de uma solução 2% de ácido clorídrico (HCl) já que este procedimento mantém a superfície do capilar lisa e deixar poucos resíduos em comparação com outras soluções ácidas ou básicas como hidróxido de sódio (NaOH), por exemplo.

A lixiviação parece não ser crítica para a sílica fundida, visto que a concentração de metais em sua superfície é muito baixa em comparação com o vidro. Por exemplo, Mayer aplica a lixiviação com ácido clorídrico 18% a uma temperatura de 100 °C por um período de 12 horas durante o preparo do capilar. Já Xu e Sumpter iniciam diretamente pelo processo de desidratação e desativação ^[11-13].

1.4.2. Lavagem

A lavagem consiste basicamente em passar pela coluna a mesma solução utilizada na lixiviação, eliminando assim, o volume usado anteriormente e dissolvendo qualquer material ainda presente na camada superficial.

1.4.3. Desidratação

A desidratação consiste no transporte de moléculas de água, resultantes da solução de lixiviação ou da desidratação entre grupos silanol vizinhos, para fora da coluna, por um fluxo de gás. Este procedimento é realizado geralmente em temperaturas superiores a 150 °C por algumas horas e é aconselhável para colunas curtas. O uso de uma bomba de vácuo ou um fluxo de solvente na qual a água é solúvel, também é um excelente meio para se conseguir uma boa desidratação ^[9,10].

1.4.4. Persililação

A persililação pode ser a etapa mais importante para se conseguir uma coluna inerte, ou seja, impossibilitada de afetar o processo de separação. Essa idéia conduziu durante anos as pesquisas que garantiram a expansão da *HRGC*.

A silanização serve para introduzir grupos orgânicos específicos na superfície do capilar ao reagir com os grupos Si-OH. Um dos agentes silanizantes mais conhecidos é o hexametildisilazano (HMDS), sendo a reação apresentada a seguir análoga para outros agentes desta mesma classe ^[14].

Figura 5: Reação entre os grupos silanol e o reagente HMDS.

A seleção de um agente silanizante adequado não é uma tarefa simples. O mais tradicional fica entre os silazanos e siloxanos. Segundo Grob ^[10], o bom agente deve resistir às altas temperaturas usadas na preparação da coluna e, conseqüentemente, no seu posterior uso, além de possuir boa compatibilidade com a fase estacionária escolhida para o recobrimento. A eficiência máxima de separação é atingida quando a fase estacionária depositada na coluna é distribuída de forma uniforme, ou seja, um filme sem interrupções, seções finas e espessas, ou até mesmo gotas. Assim, para produzir um filme homogêneo, é necessário que a superfície interna da coluna seja molhável (*wettable*) por uma dada fase estacionária. Desta forma, experimentalmente e fundamentada na similaridade estrutural, a persililação tem que produzir boa “molhabilidade”. Por exemplo, um agente silanizante que possui grupos fenil seria ideal para o uso em recobrimentos com fases estacionárias que também os possuam. A **Figura 6** mostra a estrutura do Hexametildisilazano (HMDS), Tetrafenildimetildisilazano (TPDMDS) e difeniltetrametildisilazano (DPTMDS) ^[8,10].

Figura 6: Estrutura química de alguns agentes silanizantes.

O processo consiste em preencher uma porcentagem do comprimento do capilar com a solução do agente silanizante, fechar as extremidades e aquecer em um forno por certo período de tempo. Nesta etapa, a temperatura e o tempo usados são muito importantes para que a reação ocorra, o que gerou outro ponto de divergência entre os pesquisadores. Por exemplo, Ven e colaboradores ^[14] em estudo usando análises por ressonância magnética nuclear de ²⁹Si e medidas de absorção na região do infra-vermelho, descreveu a formação do grupo R-SiNH₂ que é mais ativo que o próprio grupo silanol, após silanização usando HMDS a temperaturas superiores a 400 °C. Em experimentos usando também HMDS puro

sob diferentes condições, Welsch conseguiu uma inatividade nunca vista por ele antes usando temperaturas ao redor de 300 °C; diferente dos 380 – 400 °C proposto anteriormente por Grob ^[15,7]. Porém, o próprio Welsch publicou um artigo alguns anos mais tarde que sugeria a silanização a 340 °C por um período de 13 a 14 horas como sendo suficiente para uma completa desativação ^[16]. Já Tríska e colaboradores realizaram a reação de silanização a 350 °C por um período de 24 horas, mas Markides descreve que a melhor desativação alcançada foi a 350 °C por um período de apenas 10 horas ^[17,18].

1.4.5. Recobrimento

Após a desativação, a parede interna da coluna capilar é recoberta com a fase estacionária. O mais importante e difícil de se conseguir nesta etapa é produzir um filme homogêneo ao longo de todo capilar; e isso depende da “molhabilidade” conseguida após a silanização, velocidade de evaporação do solvente e de uma temperatura constante durante o processo. Mayer, usando microscopia eletrônica, mostrou a formação de bolhas e ondas no recobrimento com fases estacionárias com alta concentração de grupos fenil ^[19].

Existem duas técnicas para tal processo: o recobrimento dinâmico e o recobrimento estático.

O recobrimento dinâmico consiste em preencher a coluna com a solução de fase estacionária e empurrá-la com um gás, deixando um depósito de filme fino na parede. O fluxo de gás continua até a evaporação do solvente, a uma temperatura elevada. A dificuldade deste método é predizer a espessura exata do

filme, pois a mesma é dependente da velocidade, viscosidade e concentração da solução.

O método do **recobrimento estático** foi primeiro desenvolvido por Golay, mas Bouche e Verzele em 1968, fizeram com que o processo dinâmico fosse praticamente abandonado, permanecendo um marco na história da preparação de colunas. Seu artigo original e listava os pontos fracos do recobrimento dinâmico [20].

O processo de recobrimento estático pode ser descrito como um processo de evaporação do solvente da solução de fase estacionária, fazendo com que o vapor passe para fora da coluna com auxílio da diferença de pressão, ou seja, aplicando “vácuo” em uma das extremidades do capilar, como mostra a **Figura 7**. Quando a frente da solução recuar por evaporação do solvente, um pouco da solução é espalhada na parede interna da coluna aumentando a área efetiva para evaporação, formando assim, um filme da fase. Neste caso, a coluna é completamente preenchida com a solução da fase estacionária e sua temperatura não deve variar ao longo de seu comprimento para garantir uma espessura de filme uniforme [10, 20].

Figura 7: Recobrimento estático em uma coluna capilar. 1) solução de fase estacionária; 2) filme da fase estacionária; 3) menisco formado pela evaporação do solvente.

As vantagens do recobrimento estático frente ao processo dinâmico são basicamente:

- 1) Não existem limitações relacionadas à viscosidade (exceto para recobrimentos muito espessos), sendo possível o recobrimento com polímeros de altas massas molares;
- 2) Proporciona melhor resultado no recobrimento sem tantas influências externas como no processo dinâmico;
- 3) A espessura do filme é perfeitamente predita baseando-se na seguinte equação ^[10]:

$$\text{Espessura do filme } (\mu\text{m}) = 2,5 \times \text{DI (mm)} \times \text{C (\%)}$$

Onde,

DI: diâmetro interno da coluna capilar, dada em milímetros;

C: concentração da solução de fase estacionária, dada em massa de fase estacionária por volume de solução.

Entre as principais fases estacionárias destacam-se os polímeros líquidos de polisiloxanos; que são usados em 90% das separações feitas em laboratórios analíticos. Novas fases podem ser produzidas com a inserção de novos grupos funcionais nos grupos pendentes dos siloxanos, como por exemplo, grupos fenil ou ciano ^[21]. **A Figura 8** mostra a estrutura do poli(dimetilsiloxano) - PDMS e a Tabela 1 mostra a composição química de algumas fases estacionárias conhecidas comercialmente.

Figura 8: Estrutura química do PDMS.

Tabela 1: Composição química de algumas fases estacionárias fabricadas a partir do PDMS.

Código	Estrutura
OV-73	5% fenil
OV-17	50% fenil
OV-1701	7% fenil, 7% cianopropil
OV-61	33% fenil
OV-31	17% cianopropil

Um segundo grupo de polímeros que tem inúmeras aplicações nesta área são os polietileno glicóis (PEGs). Um exemplo de aplicação bem estabelecida é na análise de compostos voláteis em bebidas alcoólicas e de compostos polares cujos pontos de ebulição são semelhantes, dificilmente separados em polisiloxanos.

Alguns dos PEGs modificados são estáveis à temperaturas de até 320 °C. Porém, algumas características desfavoráveis como, por exemplo, a fácil oxidação e a degradação em baixas temperaturas, restringem o uso do PEG como fase estacionária. O PEG mais utilizado como fase estacionária possui 20.000 unidades de massa atômica e é conhecido como Carbowax-20M (**Figura 9**). No entanto, muitas destas desvantagens podem ser eliminadas com o desenvolvimento de métodos de imobilização (*cross-linking*)^[22].

Figura 9: Estrutura do Carbowax.

1.4.6. Imobilização e ligação cruzada

K. Grob e G. Grob denotam o termo *cross-linking* (entrecruzamento) como o procedimento usado para produzir ligações covalentes intermoleculares e entre a parede do tubo e a fase estacionária. As ligações químicas estendem o intervalo de temperatura de trabalho e estabilizam o filme da fase estacionária sobre a parede interna do tubo, tornando a fase estacionária mais robusta, e impedindo a redissolução da mesma no solvente quando a amostra é injetada. Este procedimento é importante na redução da “sangria” da coluna se torna indispensável com o aumento da polaridade da fase e da espessura do filme^[23].

A “sangria” é o termo utilizado para descrever o desprendimento de fase estacionária em um capilar durante uma corrida cromatográfica. Com o aumento da temperatura de análise, pequenas porções de fase podem se soltar da parede interna da coluna e originar um sinal no detector do equipamento.

As técnicas de imobilização foram primeiramente estudadas pelos produtores de silicone, sendo uma idéia cientificamente simples:

- 1) Reações radicalares são induzidas pela adição de geradores de radicais;
- 2) Reações radicalares são induzidas por calor;
- 3) Condensação de grupos silanol são induzidas por calor.

Sendo assim, a alternativa mais interessante no preparo de colunas com fases imobilizadas envolve a adição de peróxidos à fase líquida, mais comumente azo-terc-butano (ATB) ou azo-terc-octano (ATO). Após terminada a deposição do

filme, uma pequena quantidade destes reagentes é inserida no interior da coluna e o aquecimento do tubo garante que a imobilização da fase ocorra ^[10].

Fases estacionárias a base de silicone apresentam massa molecular elevada. Os silicones que apresentam altos percentuais de fenil ou ciano substituídos não possuem solubilidade adequada para preparar a solução de recobrimento. Por isso, a polimerização é feita *in situ*, adicionando-se oligômeros de massa molecular baixa no interior da coluna ^[6].

Esta é praticamente a última etapa no processo de preparação de uma coluna capilar para CG. O próximo passo é submeter a coluna à uma avaliação antes de utilizá-la nas aplicações de interesse. Isto pode ser feito por meio de uma simples análise onde os compostos dão informações sobre a qualidade do novo capilar.

1.4.7. Teste de Grob

A qualidade de uma coluna capilar não é avaliada apenas por uma separação eficiente, mas também pelos diferentes tipos de adsorção que possam ocorrer entre os analitos e a parede interna do tubo. Sendo assim, faz-se necessário um bom teste após sua fabricação.

Após muitos estudos, Grob ^[24] propôs em 1978 uma mistura-teste que considerava ser capaz de dar informações não só sobre a eficácia da injeção e o tempo morto, como também o acesso dos analitos à grupos silanóis ou contaminantes (água, metais, entre outros). Seu trabalho foi um marco para avaliação de colunas. Esta mistura continha hidrocarbonetos, um fenol

substituído, uma amina, álcoois, um diol e ésteres. Segundo Grob os testes deveriam possuir as seguintes características:

- 1) Consistir em uma simples corrida cromatográfica;
- 2) A mistura-teste deveria conter todos os compostos necessários para dar informações básicas sobre a coluna;
- 3) O mesmo teste deve servir para todas as fases estacionárias;
- 4) Alguns aspectos quantitativos devem ser incluídos como forma e altura dos picos;
- 5) As condições devem ser padronizadas para posterior comparação de resultados;
- 6) Os componentes da mistura devem eluir relativamente longe uns dos outro para evitar interações entre eles.

Neste caso, as classes de compostos escolhidos têm uma função. Os hidrocarbonetos apresentam picos simétricos permitindo os cálculos sobre a eficiência cromatográfica, eficácia da injeção e também identifica problemas no sistema, como por exemplo, erros na instalação da coluna ou insuficiência de gás. Os ácidos orgânicos, as aminas (bases), os álcoois e o diol mostram as possíveis interações com grupos silanol ou moléculas de água. Os aldeídos identificam adsorção que não se dá por ligação de hidrogênio. E, por fim, os ésteres metílicos possuem coeficientes de partição muito próximos em diferentes fases estacionárias, detectando irregularidades no recobrimento da coluna ^[24].

Quando estudamos adsorção temos que considerar todo o sistema cromatográfico (injetor, coluna, detector). Uma adsorção ocorrendo no injetor

pode gerar conclusões erradas sobre a coluna. Por outro lado, altas temperaturas no injetor, quando próximo de 300 °C, e o curto espaço de tempo de permanência dos analitos no detector, parece não contribuir muito para a adsorção total do sistema. Usando um *liner* silanizado, a contribuição do injetor na adsorção é menor que 5% ^[25].

Inúmeros testes para colunas surgiram após o sugerido por Grob de acordo com a demanda de mercado. Alguns continham compostos menos impedidos estericamente, para favorecer o acesso a possíveis sítios ativos, e compostos mais ácidos ou básicos, tentando distinguir as colunas “adequadas” das “excelentes”.

Outra questão citada por pesquisadores refere-se ao solvente e a programação de temperatura usada nos testes de colunas. Segundo Jennings, um solvente que elui antes dos compostos presentes na mistura-teste pode impedir a interação dos mesmos com os sítios ativos, principalmente para solventes polares. As altas temperaturas também diminuem a interação soluto-superfície. Ele sugere um novo teste isotérmico a baixas temperaturas (70 -100 °C) usando diisopropil benzeno como solvente, que elui depois dos analitos e introduz novos compostos como, por exemplo, a picolina, o 1,2 pentanodiol, o ácido propiônico e o trimetil fosfato. Destaca também que injeções de volumes de amostra menores que 10 nL na coluna facilita a identificação de adsorção, o que é mascarado por altas concentrações de analitos ^[26].

Apesar das inúmeras sugestões ao longo dos últimos anos, a mistura de Grob é ainda usada pelas empresas que fabricam colunas capilares e mostra-se eficiente como um primeiro teste de qualidade ^[27,28].

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é adequar, para as colunas capilares modernas de sílica fundida, as etapas empregadas no pré-tratamento dos tubos utilizados no preparo de colunas, verificando sua real necessidade na produção de colunas capilares, inertes e eficientes. Isso significa:

- Estudar o comportamento da lixiviação ácida e básica;
- Avaliar a desativação da superfície da sílica usando agentes silanizantes, estudando as condições para a reação de silanização que melhor satisfazem o recobrimento para fases estacionárias semi-polares e polares, ou seja, produzem “molhabilidade” adequada.
- Analisar o processo de recobrimento do tubo com a fase estacionária e sua reprodutibilidade;
- Buscar alternativas para desativação do capila.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e equipamentos utilizados

- Fase estacionária OV-73 (5,5% fenilpolisiloxano) e OV-17 (50% fenilpolisiloxano): Alltech Associates Inc., Ohio (USA)
Fase estacionária de PEG: Alltech Associates Inc., Ohio (USA).
- Agentes silanizantes
HMDS: Merck, Darmstadt (Germany)
TPDMDS e DPTMDS: Aldrich Chem.Co., Munich (Germany)
- Reagente Azo-terc-butano: Aldrich Chem.Co., Munich (Germany).
- Solventes pentano e diclorometano: Merck, Rio de Janeiro (Brasil).
- Gás N₂ usado nos sistemas de preparo do tubo: AGA, Barueri (Brasil).
- Tubos de sílica fundida HT: Polymicro Technologies Inc., Phoenix (USA)
- Cromatógrafo a Gás Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector por ionização de chama *FID*.

3.2. Tubos

Todos os ensaios realizados utilizaram tubos de sílica fundida cortados. Suas dimensões foram padronizadas em 10 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

3.3. Sistemas de preenchimento e recobrimento do tubo

Montou-se um sistema um para o preenchimento do capilar. Por meio da pressurização de um frasco (3) contendo a solução de trabalho, o líquido flui para dentro do tubo, como mostra a **Figura 10**.

Conforme descrito no processo de recobrimento estático, montou-se um outro sistema usado para a evaporação do solvente, contendo a fase estacionária durante a etapa da produção do filme fino (**Figura 11**).

Na etapa de recobrimento, as colunas já preenchidas com a solução da fase estacionária foram colocadas em um banho de água termostatizado a 28 °C para se evitar ao máximo a variação de temperatura durante a evaporação do solvente. Uma das entradas do capilar foi mergulhada em nitrogênio líquido enquanto na outra se aplicou “vácuo” com o auxílio de uma bomba.

A temperatura ambiente na sala onde o sistema se encontrava também foi controlada por meio de aparelhos de ar condicionado.

Figura 10: Sistema de preenchimento do capilar. 1) cilindro de gás para pressurização, 2) controlador de baixa pressão, 3) frasco com a solução de interesse, 4) frasco de pressurização, 5) coluna capilar.

Figura 11: Sistema de recobrimento do tubo. 1) garrafa térmica contendo N_2 líquido, 2) aquário com banho de água termostatizado, 3) coluna capilar enrolada em um aro de metal, 4) interface para a bomba, 5) bomba de vácuo.

3.4. Processo de preparo das colunas capilares

3.4.1. Etapa da Lixiviação

Usando o sistema de preenchimento do tubo, verificou-se o efeito da lixiviação conforme descrito por Grob ^[10]. Preencheram-se 25% do comprimento da coluna com solução de HCl , tampou-se as extremidades do tubo usando um maçarico, levando-o ao forno logo em seguida a 220° C por 3 horas. Foram testadas soluções de HCl 2% e 5%; e uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Após este tratamento, o capilar foi retirado do forno e suas extremidades foram abertas para que seguisse o processo de lavagem.

3.4.2. Etapa da Lavagem

Esta etapa consistiu em passar pelo capilar em torno de 1,5 mL da mesma solução usada para a lixiviação e 1,5 mL de diclorometano. A secagem interna do capilar foi realizada apenas com a passagem de N₂ por 30 minutos.

3.4.3. Etapa da Desidratação

Após a secagem, foi utilizado um forno de cromatógrafo para aquecer os tubos a uma temperatura de 200 °C por um período de 2 horas. Simultaneamente,

conectou-se um fluxo de N₂ em uma das entradas do tubo de sílica fundida deixando a outra livre para a saída do gás.

3.4.4. Etapa da Persililação

Análogo ao processo de lixiviação, a desativação do capilar foi estudada preenchendo-se 10% de seu comprimento com a solução do agente silanizante sem diluições. A solução foi transportada a uma taxa de 2 cm/s usando um fluxo de nitrogênio até que saísse na outra extremidade. Logo após, vedaram-se suas extremidades em um maçarico e, então, o capilar foi aquecido em um forno sob temperaturas de reação que variaram de 300 a 400 °C por um período de tempo de 6 a 12 horas ^[7,8]. Foram utilizados o HMDS, DPTMDS e TPDMS, separadamente, como agente silanizantes.

Terminado este processo, os capilares seguiram para a etapa de recobrimento com a fase estacionária.

3.4.5. Etapa do Recobrimento

As colunas preparadas nos ensaios foram recobertas com a fase estacionária OV-73 ou OV-17, produzindo um filme de 0,25 µm, seguindo o descrito anteriormente para o **recobrimento estático** (Figura 11). Para isto, pesou-se 0,0161g da fase diluindo-a em 4 mL de pentano no caso da OV-73, mas

para OV-17 utilizou-se uma mistura 1:1 de diclorometano e pentano para diluir a fase.

Nesta etapa, o PEG também foi usado na forma de filmes muito finos (0,01 0,05 e 0,10 μm) com a intuição de que serviriam para desativar a parede interna do capilar.

3.4.6. *Cross-linking*

Na imobilização da fase estacionária, uma pequena gota de azo-terc-butano foi colocada em um frasco de vidro. Este, por sua vez, foi pressurizado usando o sistema mostrado na Figura 10, fazendo com que o reagente percorresse a coluna capilar por um período de 20 minutos. Em seguida, as colunas eram vedadas no maçarico e colocadas no forno a 220 °C por um período de 1 hora. Em todas as colunas recobertas com a fase estacionária, o procedimento de *cross-linking* foi repetido 3 vezes.

3.4.7. *Condicionamento das colunas preparadas*

Terminado o processo de imobilização da fase estacionária, as colunas passaram por uma etapa de condicionamento, onde foram submetidas a seguinte rampa de aquecimento: 30 °C – 0,5 °C/min – 300 °C – 60 min.

3.5. Teste para as colunas preparadas

Baseado no teste de Grob preparou-se uma solução-teste para avaliar a atividade das colunas produzidas. Esta continha os seguintes compostos: undecano, octadecano, hexadecano, octanol, dimetilanilina e dimetilfenol.

Os compostos foram injetados isoladamente para o prévio conhecimento dos tempos de retenção de cada um e, posteriormente, como uma mistura para avaliação de coluna.

3.6. Condições cromatográficas

Todas as colunas capilares produzidas foram avaliadas injetando-se 1 μ L da mistura-teste em uma corrida cromatográfica simples com a rampa de aquecimento de 40 °C – 8 °C/min – 300 °C em um detector *FID*. O fluxo de gás usado nas análises foi de 1 mL por minuto. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 300 °C respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Estudo da influência da lixiviação*

A fim de se avaliar o efeito da lixiviação sobre a superfície do capilar, diferentes concentrações de solução de HCl foram testadas, **2%** e **5%**, originando os cromatogramas mostrados nas **Figuras 12 e 13**, respectivamente. Nestes ensaios, as colunas não passaram por nenhum outro processo de pré-tratamento. Apenas a lixiviação, seguida da lavagem e secagem com a passagem de ar.

A primeira fase estacionária escolhida para os testes foi a OV-73. A facilidade de manuseio devido à viscosidade, minimiza os erros durante as pesagens em comparação com a fase OV-17.

O motivo da escolha da espessura de filme ser de 0,25 μm é devido ao fato de filmes mais espessos que 0,30 μm não permitirem a avaliação de interações dos compostos analisados com a superfície da sílica.

Os picos indicam, respectivamente: 1- octanol, 2- co-eluição entre o undecano e dimetilanilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.

Figura 12: Cromatograma da mistura teste analisada em uma coluna lixiviada com HCl 2% e recoberta com filme 0,25 µm de fase OV-73. 1- octanol, 2- co-eluição entre o undecano e dimetilanilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.

Figura 13: Cromatograma da mistura teste analisada em uma coluna lixiviada com solução 5% de HCl e recoberta com filme 0,25 µm de fase OV-73.

Nota-se que a concentração da solução de HCl não influenciou na diferença de atividade entre as duas colunas. Ambos cromatogramas mostraram interação composto-superfície, indicado pelas caudas nos três primeiros picos

Avaliou-se também a possibilidade do uso de uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para verificar seu efeito na lixiviação realizando-se vários experimentos. No entanto, ao retirar as colunas capilares do forno, estavam elas fragilizadas e quebravam com facilidade. Possivelmente, ao usar a lixiviação básica, a formação de poros ou ranhuras danificou o material. Por isso, a continuidade do processo de preparo do tubo ficou inviabilizada e nenhum cromatograma pôde ser obtido. Optou-se então apenas pela lixiviação ácida^[10].

Ao verificar a influência da lixiviação sobre a etapa de silanização, uma coluna apenas lixiviada com solução de HCl 2%, e secada internamente com a passagem de nitrogênio sem aquecimento, ou seja, sem sofrer a desidratação, foi comparada com uma segunda coluna, que sofreu todas as outras etapas de pré-tratamento do tubo, exceto a lixiviação, além de uma terceira coluna que recebeu apenas a silanização. O importante é destacar que todas estas colunas foram silanizadas com HMDS a 330 °C por um período de 6 horas e recobertas com a fase OV-73^[9]. Os cromatogramas da mistura-teste obtidos são mostrados nas **Figuras 14, 15 e 16**, respectivamente.

Como mostrado na Figura 11, os analitos e a ordem de eluição são os mesmos para os cromatogramas mostrados anteriormente, não sendo necessário identificá-los em cada figura. A partir deste ponto, o importante é observar o formato dos picos, o qual indica a desativação ou não da parede interna do capilar.

Figura 14: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna lixiviada com solução HCl 2% , lavada e secada apenas com a passagem de ar.

Figura 15: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas do pré-tratamento do tubo, exceto a lixiviação.

Figura 16: Cromatograma da mistura-teste analisada em uma coluna que não sofreu a etapa da lixiviação, apenas silanização com HMDS.

Podem-se notar caudas nos picos em todos cromatogramas. A possível presença de alguma impureza no cromatograma 14 e 15 não impediu a visualização da imperfeição na forma dos primeiros picos. A partir daí, juntamente com os resultados mostrados nas Figuras 11 e 12, entendeu-se que a lixiviação para a sílica fundida poderia ter mais a função de produzir grupos silanol do que eliminar sítios ativos na superfície da sílica, o que torna a coluna mais ativa se a silanização não for eficiente. Notou-se, também, a importância de uma boa lavagem seguida da desidratação quando se faz a lixiviação evitando, assim, a presença de resíduos originários da solução ácida.

Não se pode efetuar a lixiviação sem as próximas duas etapas (lavagem e desidratação). No entanto, é possível efetuar a desidratação do capilar de sílica fundida sem antes ter realizado a lixiviação a fim de eliminar moléculas de água

ou desidratar grupos silanol vizinhos. Nesta etapa, temperaturas mais altas por períodos de tempos mais longos causaram a perda da estabilidade mecânica do tubo. Segundo Grob ^[9], para a sílica fundida as escolhas nas condições do pré-tratamento são mais limitadas.

Assim, a etapa da lixiviação foi mantida a 220 °C por um período de 2 horas porque não mostrou influenciar positivamente na etapa da silanização. Da mesma forma, a silanização foi realizada em condições mais amenas buscando não danificar os capilares para se obter resultados sobre a lixiviação.

Como todos os cromatogramas mostraram certa atividade nos capilares preparados, o próximo passo foi estudar as condições da reação de silanização, pois esta poderia não ter ocorrido completamente até então.

4.2. Avaliação da reação de silanização

Considerando que a lixiviação não influenciava significativamente em todo processo de preparo do tubo, buscou-se entender melhor as variáveis da reação de silanização.

O primeiro passo nesta etapa foi escolher um único agente silanizante, neste caso o HMDS, e variar a temperatura e o tempo de reação. Mesmo sabendo que a maioria das publicações científicas sobre o assunto citava colunas capilares de vidro, alguns testes foram aplicados às colunas modernas de sílica fundida.

Problemas foram observados em ensaios cuja temperatura usada foi de 400 °C em um período de tempo relativamente curto de 3 horas ou, até mesmo,

em temperaturas de 370 °C por um período de 12 horas. As colunas capilares adquiriram uma coloração marrom indicando que o revestimento externo de poliimida foi danificado, mesmo usando tubos HT, que são específicos para suportarem altas temperaturas. Como mostra a **Figura 17**, este problema compromete a resistência mecânica e, conseqüentemente, a vida útil da coluna capilar, não sendo um procedimento eficaz.

Figura 17: Comparação entre uma coluna danificada pela alta temperatura (coloração escura) e outra com características normais (coloração clara).

Por outro lado, tentativas de silanização a 300 e 320 °C durante 6 horas mostraram muitas sobras de agente silanizante no interior da coluna, notadas visualmente. Neste ponto a dúvida é se a reação de fato ocorreu ou não, podendo ser mais uma variável pois deixa resíduos do líquido no capilar.

Empiricamente, optou-se então por utilizar uma temperatura intermediária de 350 °C por um período de 6 horas durante a reação de silanização. Ensaios sob estas condições foram realizados e a seguinte coluna capilar passou pelas etapas de lixiviação com solução de HCl 2% a 220 °C, por 2 horas, sofrendo lavagem e desidratação por 1 hora, em fluxo de nitrogênio a 220 °C e, por fim, após a silanização, o recobrimento com 0,25 µm da fase OV-73. O cromatograma da mistura-teste obtido está representado na **Figura 18** e o resultado mostrou o maior grau de desativação conseguido até então.

As condições que produziram bons resultados anteriormente usando o HMDS foram também empregadas em testes utilizando o agente silanizante DPTMDS. A **Figura 19** representa o cromatograma originado a partir de um dos ensaios.

Figura 18: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas do pré-tratamento do tubo. Silanização com HMDS a 350° C por 6 horas.

Figura 19: Cromatograma da mistura-teste em uma coluna que sofreu todas as etapas de pré-tratamento. Silanização com DPTMDS a 350° C por 6 horas.

Os picos na Figura 19 mostram adsorção, indicando certa atividade no interior da coluna capilar. As condições de reação poderiam ser outras para este agente silanizante, mas sabe-se previamente que temperaturas superiores danificariam os capilares de sílica fundida.

Apesar da esperada desativação não ocorrer, visto que o DPTMDS produz melhor “molhabilidade” e possui características de desativador não só por reagir com os grupos silanol como também por impedir estericamente o acesso dos analitos a esses, uma tentativa de silanização usando uma diluição do reagente de 1:5 em pentano, foi realizada. Essa diluição torna a solução menos viscosa quando transportada pelo interior do capilar, o que pode formar um filme fino do agente silanizante e facilitar a reação em temperaturas mais baixas^[10].

O cromatograma da **Figura 20** indica que a idéia de diminuir a concentração da solução do agente silanizante também não mostrou bons resultados. A análise da mistura-teste mostra caudas até para os dois últimos picos, os quais representam os hidrocarbonetos hexadecano e octadecano, respectivamente.

O terceiro agente silanizante (TPDMDS) foi então aplicado para que seu comportamento fosse comparado com o do reagente anterior. Considerando ainda as mesmas condições de reação dos bons resultados conseguidos para o HMDS, a tentativa de desativação do capilar foi realizada e os cromatogramas obtidos estão mostrados nas **Figuras 21 e 22**.

Algo diferente ocorreu nestes ensaios: a coluna não foi capaz de separar claramente os compostos da mistura-teste.

Figura 20: Coluna que sofreu silanização com uma solução de DPTMDS em Pentano 1:5.

Figura 21: Capilar 1 silanizado com TPDMS e recoberto com fase OV-73.

Figura 22: Capilar 2 silanizado com TPDMS e recoberto com fase OV-73.

Este novo fato pode ter uma explicação baseada na descrição de Mayer sobre a homogeneidade do recobrimento ^[19]. A “molhabilidade” é aumentada quando se usa TPDMS para fases estacionárias com alta concentração de grupos fenil. No entanto, facilmente ocorre a formação de bolhas, seções finas e espessas ou até mesmo pontos sem fase estacionária durante o processo de evaporação. Ou seja, pode-se conseguir uma boa desativação, mas perde-se eficiência de separação, principalmente nas colunas curtas. Ao mesmo tempo, filmes homogêneos são obtidos quando a etapa de silanização é omitida, mas com desativação insatisfatória.

Assim, levando-se em consideração os ensaios com os agentes silanizantes DPTMS e TPDMS, a reprodutibilidade e a homogeneidade do

recobrimento para a fase estacionária OV-73 foram questionadas. Fizeram-se necessários novos testes, uma vez que isso significava mais uma variável em todo processo.

4.3. Avaliação da reprodutibilidade do recobrimento

Uma série de 5 colunas produzidas sem nenhuma etapa de pré-tratamento do tubo, mas apenas recobertas com a fase estacionária OV-73 mostrou que a reprodutibilidade no recobrimento não é tão boa assim. Feitas seguidas uma da outra sob as mesmas condições, elas apresentaram diferentes resultados. Os cromatogramas mostrados nas **Figuras 23 e 24** indicam um ótimo recobrimento percebido pela qualidade da separação cromatográfica e até um bom grau de inatividade da coluna. No entanto, os próximos cromatogramas, referentes à mesma série de colunas, mostram recobrimentos possivelmente não homogêneos (**Figuras 25, 26 e 27**).

Acredita-se que pequenas mudanças na temperatura, no “vácuo” durante a evaporação da fase e até mesmo na “molhabilidade” da parede interna do capilar, prejudicam a homogeneidade do filme.

Durante o processo de recobrimento do capilar com a fase estacionária é possível acompanhar visualmente, com o auxílio de uma luminária, a evaporação do solvente na qual a fase está dissolvida. Nota-se que nem sempre a frente da solução caminha com a mesma velocidade apesar de se tentar ao máximo manter as mesmas condições. Algumas vezes a solução “corre” dentro do capilar e o filme não é formado, obrigando o recomeço desta etapa. Outras vezes, a taxa de

evaporação do solvente é maior no início do capilar do que no final do mesmo. No caso dos capilares com comprimento de 10 metros, este último problema não é tão freqüente.

Não se sabe a porcentagem exata de rendimento na preparação das colunas capilares. Só a observação atenta durante a etapa do recobrimento evita os problemas descritos anteriormente com mais esta variável. Assim, nesta última série de colunas, o processo de deposição da fase estacionária não foi interrompido, por motivo algum, para efeito de comparação.

A partir destes resultados, o estudo utilizando filmes de polietilenoglicol parecia plausível para confirmar a produção de filmes irregulares quando usada a fase OV-73.

Figura 23: Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 1.

Figura 24: Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 2.

Figura 25: Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 3.

Figura 26: Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 4.

Figura 27: Série de colunas que não sofreram nenhuma etapa de pré-tratamento, apenas recobrimento com OV-73. Coluna 5.

4.4. O uso de filmes finos de PEG

Sabendo-se que o PEG produz bons filmes de fase estacionária devido às ligações químicas que realiza com os grupos silanol da parede interna do capilar, a idéia de produzir filmes muito finos parecia razoável ^[22]. Estes filmes poderiam mostrar não só o bom comportamento do PEG durante o recobrimento como também a desativação do capilar.

Foram obtidos então os cromatogramas mostrados nas **Figuras 28, 29 e 30**. Eles representam colunas capilares que não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento do tubo e foram apenas recobertas com filmes de 0,01 , 0,05 e 0,1 μm de espessura, respectivamente.

Figura 28: Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,01 μm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- octanol, 5- dimetilfenol, 6- dimetilanilina.

Figura 29: Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,05 µm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- octanol, 5- dimetilanilina, 6- dimetilfenol.

Figura 30: Coluna sem pré-tratamento, apenas recoberta com um filme de 0,10 µm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- co-eluição entre octanol e dimetilanilina, 5- dimetilfenol.

Nota-se que a ordem de eluição para os compostos da mistura-teste foi alterada, mas a resolução é alta. Também, não há sinais de caudas nos picos o que indica a ausência de interação entre os compostos da mistura e a parede do capilar, mesmo para o filme mais fino (0,01 μm).

O perfil do cromatograma da coluna recoberta com o filme 0,05 μm mostrou-se o mais interessante por ser similar aos conseguidos com a fase OV-73, diferindo apenas na eluição antecipada dos hidrocarbonetos, representada pelos dois primeiros picos intensos.

Iniciou-se, então, uma série de experimentos para estudar o uso de filmes finos de PEG como agente desativador e não como fase estacionária.

4.4.1. Ensaios com a fase OV-73

Novamente, colunas recobertas com filmes de 0,05 μm de PEG e sem nenhum pré-tratamento do tubo, foram avaliadas após sofrer uma segunda deposição. Desta vez, a fase estacionária OV-73 produziu um filme de 0,25 μm por cima da fina camada de polietileno glicol.

O resultado para a análise da mistura-teste mostrou um alto grau de desativação do capilar, além da separação não ser influenciada pela camada de PEG. A eluição dos compostos continuou característica das separações realizadas anteriormente apenas quando a fase de polisiloxano era depositada. A **Figura 31** representa o cromatograma originado a partir desta análise.

Figura 31: Coluna com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG. Análise da mistura-teste. 1- octanol, 2- co-eluição entre undecano e dimetilnilina, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.

O importante após a aplicação desta técnica, é verificar a estabilidade do filme, ou seja, avaliar se quantidades consideráveis de fase estacionária desprende da parede do tubo.

Então, 6 ciclos de condicionamento seguidos, foram realizados para verificar o comportamento da fase. Nenhuma amostra é injetada e a coluna sofre apenas uma programação de temperatura. Neste caso, em especial: 30 °C – 2 °C/min – 320 °C – 30 min – 30 °C.

O cromatograma obtido indica que a “sangria” diminui com o passar do tempo (**Figura 32**). A “sangria” é algo normal em altas temperaturas para colunas novas, e tende a ficar menos evidente conforme o uso das mesmas.

Figura 32: Ciclos de condicionamento em coluna com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre o filme de 0,05 μm de PEG.

Realizado o condicionamento, uma nova análise da mistura-teste mostrou que não houve perda significativa de fase estacionária ou alterações na ordem de eluição dos compostos. Isso pode ser notado pela pouca variação no tempo de retenção (t_R) entre a primeira e a segunda análise.

A **Figura 33** mostra o cromatograma obtido após a coluna sofrer o ciclo de condicionamento, e a **Tabela 2** apresenta os respectivos tempos de retenção dos compostos da mistura-teste.

Os resultados satisfatórios induziram a realização de experimentos usando a fase estacionária OV-17, a qual possui um número de grupos fenil maior do que a OV-73.

Figura 33: Análise da mistura-teste em coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG; após ciclos de condicionamento. 1- octanol, 2- co-eluição entre undecano e dimetilaniлина, 3- dimetilfenol, 4- hexadecano, 5- octadecano.

Tabela 2 : Comparação dos tempos de retenção para uma coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-73 sobre um filme de 0,05 μm de PEG.

Picos	Antes do condicionamento t_R (min)	Após condicionamento t_R (min)
1	5,825	5,509
2	6,162	5,802
3	8,753	8,240
4	13,839	13,481
5	16,549	16,183

4.4.2. Ensaios com a fase OV-17

O mesmo ensaio, realizado agora com a fase OV-17, mostrou também resultados satisfatórios. A seqüência no procedimento de preparo do tubo foi repetida e o cromatograma a seguir mostra a análise da mistura-teste em uma coluna onde foi depositado apenas o filme de 0,05 μm de PEG (**Figura 34**).

Visto que a forma dos picos e a resolução indicaram o bom comportamento do polímero, esta mesma coluna foi recoberta com um filme de 0,25 μm de fase OV-17. Novamente, a mistura-teste foi analisada e o cromatograma obtido é mostrado na **Figura 35**.

Figura 34: Análise da mistura-teste em coluna apenas recoberta com um filme de 0,05 μm de PEG. 1- undecano, 2- hexadecano, 3- octadecano, 4- ocatanol, 5- demetilnilina, 6- dimetilfenol.

Figura 35: Análise da mistura-teste em coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG. 1- octanol, 2- undecano, 3- dimetilanolina, 4- dimetilfenol, 5- hexadecano, 6- octadecano.

O alto grau de inatividade da coluna e a boa resolução para a maioria dos compostos indicam um bom recobrimento, possivelmente sem bolhas ou falhas. Isso significa que a fina camada de PEG pode ser considerada “molhável” pela fase OV-17.

Apesar disso, o teste do ciclo de condicionamento e uma segunda análise da mistura-teste é inevitável. Portanto, a coluna passou por seguidas rampas de aquecimento e o cromatograma obtido está mostrado na **Figura 36**.

Mais uma vez, a fase estacionária mostrou o comportamento normal de colunas recém fabricadas. Para a OV-17, a “sangria” diminui após o segundo ciclo.

Figura 36: Ciclos de condicionamento para a coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG.

A análise da mistura-teste para esta coluna, após o ciclo de condicionamento indicou o mesmo perfil cromatográfico, como mostra a **Figura 37**; os tempos de retenção para os compostos da mistura estão representados na **Tabela 3**.

Os resultados foram satisfatórios, e indicam que a estabilidade do filme de OV-17 é boa, suportando temperaturas de até 320 °C, mesmo depositada sobre o filme de PEG. Esta coluna capilar é inerte e eficiente. Os tempos de retenção para os compostos não sofreram grande variação entre as análises antes e depois do ciclo de condicionamento, onde normalmente, um filme mal fixado perderia suas características de separação.

Figura 37: Análise da mistura-teste após ciclos de condicionamento. Coluna recoberta com um filme de 0,25 μm da fase OV-17 sobre um filme 0,05 μm de PEG. 1- octanol, 2- undecano, 3- dimetilanilina, 4- dimetilfenol, 5- hexadecano, 6- octadecano.

Tabela 3: Tempos de retenção para uma coluna recoberta com filme de 0,25 μm de OV-17 sobre um filme de 0,05 μm de PEG.

Picos	Antes do condicionamento	Após condicionamento
	t_R (min)	t_R (min)
1	4,099	3,997
2	6,354	6,289
3	9,530	9,411
4	9,688	9,576
5	12,179	12,043
6	15,017	14,870

5. CONCLUSÕES

Há certa dificuldade de analisar a inter-relação entre cada etapa do pré-tratamento do tubo. O desenvolvimento das colunas capilares nos últimos anos não está refletido na literatura, devido à produção hoje ser segredo comercial, o que torna difícil a pesquisa científica sobre o assunto.

Não se pode dizer que a etapas de lixiviação seja realmente necessária no pré-tratamento dos tubos de sílica-fundida. Este procedimento pode deixar resíduos no interior do capilar tornando-o mais ativo, além de não mostrar melhoras nos resultados.

A reação de silanização à temperatura de 350 °C por período de 6 horas parece mais adequada para a sílica fundida visto que temperaturas maiores danificaram o capilar. No entanto, apenas o HMDS mostrou-se eficaz sob estas condições. O TPDMS e o DPTMS não apresentaram boa compatibilidade com o recobrimento, quando este realizado com a fase OV-73.

Por outro lado, o polietileno glicol (PEG) foi uma boa alternativa. Enquanto que as fases OV-73 e OV-17 não reproduzem os filmes quando depositadas diretamente no tubo (silanizado ou não), os filmes finos de PEG mostraram-se muito eficientes neste ponto. Um filme de 0,01 µm pode apresentar não só uma ótima separação como também atuar como agente desativador.

Os resultados obtidos com as colunas capilares produzidas usando o duplo filme (PEG e OV) permitem concluir que estas são estáveis e pouco ativas, sendo uma ótima opção na preparação de colunas inertes. O filme de PEG não interfere na separação e atua como agente desativador.

5.1. Sugestões para trabalhos futuros

Visto que os filmes de PEG mostraram-se eficientes, é interessante o estudo com filmes cada vez menos espessos para conhecer o limite onde sua característica desativadora será ainda eficaz.

Outro ponto importante, após o recobrimento com a fase estacionária de interesse, é estudar a máxima temperatura que esta nova coluna suportará durante uma análise, sem perder suas características.

Lembrando que a variedade de fases estacionárias é enorme, o laboratório pode produzir suas próprias colunas de acordo com a aplicabilidade desejada, verificando a qualidade do recobrimento quando realizado por cima do microfilme de PEG.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1997. p.141-152.
2. LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240 p.
3. PEREIRA, A.S.; NETO, F.R.A. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 370-379, 2000.
4. DESTY, D.H.; HARESDAPE, J.N.; WHYMAN, B.H.F. Construction of long lengths of coiled glass capillary. **Analytical Chemistry**, v. 32, p. 302-304, 1960.
5. GRIFFIN, G. Fused-silica capillary – the story behind the technology. **LCGC North America**, v. 20, n.10, p. 928-938, 2002.
6. SILVA, Denise Domingos da. **Preparo de colunas capilares utilizando o polímero poliuretana sintetizado a partir do óleo de mamona como fase estacionária – cromatografia gasosa**. 2001. 156 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
7. GROB, K.; GROB, G. New approach to capillary columns for gas chromatography? Condensation of hydroxyl-terminated stationary phases. **Journal of Chromatography**, v. 347, p. 351-356, 1985.
8. SCHOMBURG, G.; HUSMANN, H.; BEHLAU, H. Properties of untreated and treated glass capillary surfaces and their contribution to solute-stationary phase interaction and film fixation of the stationary liquid. **Journal of Chromatography**, v. 203, p. 179-191, 1981.
9. GROB, K.; GROB, G. Preparation of inert glass capillary columns for gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 244, p. 197-208, 1982.
10. GROB, K. **Making and manipulation capillary columns for gas chromatography**. Heidelberg: Huethig, 1986. 232 p.
11. MAYER, B.X.; LORBEER, E. A fused silica capillary column coated with a medium polar stationary phase for HTGC. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v.18, p. 504-506, 1995.

- 12.XU, B.;VERMEULEN, N.P.E. Fused silica capillary deactivation with D₄ in the presence of oxygen. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 9, p. 679-682, 1986.
- 13.SUMPTER, S.R.; WOOLLEY, C.L.; HUANG, E.C.; MARKIDES, K.E.; LEE, M.L. Static coating of 5 to 50 µm I.D. capillary columns for open tubular column chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 517, p. 503-519, 1990.
- 14.VEN, L.J.M. van de; RUTTEN,G; RIJKIS,J.A.; HAAN,J.W. Deactivation with silazanes in chromatography, mechanism of the reaction and practical consequences in capillary GC and RP-HPLC. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 9, p. 741-746, 1986.
- 15.WELSCH, T. High temperature silylation in the production of inert glass capillary columns. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 11, p. 471-479, 1988
- 16.WELSCH, T; MÜLLER, R.; ENGEWALD, W.; WERNER, G. Surface modification of glass capillaries by high-temperature silylation. **Journal of Chromatography**, v. 241, p. 41-48, 1982.
- 17.TRÍSKA, J.; HULÍK, R.; VODICKA, L.; JANDA, V.; CAPKA, M. Poly(methyloctadecyl)hydrosiloxane- a deactivation reagent for capillary columns. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 11, p. 220-222, 1998.
- 18.MARKIDES.K.E; TARBET, B.J.; WOOLLEY, C.L.; SCHRENGENBERGER, C.M.; BRADSHAW, J.S.; LEE, M.L.; BARTLE, K.D. Deactivation of fused silica capillary columns with phenylhydrosiloxanes. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 8, p. 378-385, 1985.
- 19.MAYER, B.X; RAUTER, W.; RAUCHBAUER, G.; TOMASTIK, C.; BANGERT, H. Approaches for the coating of capillary columns with highly phenylated stationary phases for high-temperature GC. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 335-342, 2004.
- 20.XU, B.;VERMEULEN,N.P.E.Free release static coating of glass capillary columns. **Chromatographia**, v.18, n. 9, p. 520-524, 1984.
- 21.ZEEUW, J.; LUONG, J. Developments in stationary phase technology for gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 594-607, 2002.
- 22.SHENDE, C.; KABIR, A.; TOWNSEND, E.; MALIK, A. Sol-gel poly(ethylene glycol) stationary phase for high-resolution capillary gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 3518-3530, 2003.

- 23.GROB, K.; GROB,G. Capillary columns with immobilized stationary phases. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 4, p. 491-494, 1981.
- 24.GROB, K; GROB, G. Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. **Journal of Chromatography**, v. 156, p. 1-20, 1978.
- 25.DRESEN, R.J.M.N.; HENDERICKX, H.J.W.; VAN DER WAL, S. Capillary GC Column Performance Test for Basic Analytes. **Journal of Microcolumn Separation**, v.10, n. 8, p. 661-669, 1998.
- 26.JENNINGS, W.; GRAS, R.; LUONG, J. An advanced solventless column test for capillary GC columns. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 2480-2492, 2007.
- 27.SUPELCO. **Produtos de cromatografia para análise e purificação**: catálogo. São Paulo: Sigma –Aldrich, 2007/8. 262 p.
- 28.ALLTECH. **Chromatography sourcebook**: catálogo. Deerfield: Alltech Corporate Headquarters, 2003/04. 66 p.