



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



ISABELA SAYURI AMBRÓSIO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE ACETATO
BUTIRATO DE CELULOSE COMO FASE ESTACIONÁRIA PARA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

ITUIUTABA / MG

2019

ISABELA SAYURI AMBRÓSIO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE ACETATO BUTIRATO
DE CELULOSE COMO FASE ESTACIONÁRIA PARA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA / MG

2019

ISABELA SAYURI AMBRÓSIO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE ACETATO BUTIRATO
DE CELULOSE COMO FASE ESTACIONÁRIA PARA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

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

10 de julho de 2019

Banca examinadora

Prof. Dr. André Luiz dos Santos

Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai por me proporcionar a oportunidade de seguir meus sonhos, por todo amor e apoio incondicional, por tudo que fez e faz por mim. Te amo. Muito obrigada.

Ao meu companheiro Matheus por não me deixar desistir, por todo carinho, apoio e amizade nos momentos difíceis. Te amo.

Ao orientador Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria pela sua orientação por ter me aceitado no grupo de pesquisa CROMAT, por todos os ensinamentos e apoio antes e durante toda minha iniciação científica.

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

A todos os amigos do grupo de pesquisa, Allyson, Kátia, Lais, Andressa, Giselle, Carlão, Marcela, Ana Maria, pela amizade e apoio.

A Prof. Dra. Rosana M. N. Assunção por toda a contribuição na realização desse trabalho.

As minhas amigas Angélica, Milena e Beatriz, que mesmo de longe continuam me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos que fiz aqui Jeniffer, Matheus, Guilherme, Henrique, Wilker por permanecerem mesmo após tantos anos.

Aos amigos de laboratório Marcos, Diele, Lauro pelos momentos de descontração.

A todos os professores pelos seus ensinamentos ao longo dessa trajetória, meu muito obrigada.

A CNPq pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa e à FINEP pelo suporte financeiro para a infraestrutura do laboratório de pesquisa (01.11.0135.00) e de equipamentos multiusuários do Pontal (01.13.0371.00).

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

RESUMO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação amplamente difundida no meio acadêmico e industrial, devido ao seu vasto campo de aplicação e alta capacidade de separar e quantificar diversas substâncias. No entanto, a CLAE apresenta dois principais problemas, sendo o primeiro a grande geração de resíduos orgânicos tóxicos e de difícil tratamento, proveniente de sua fase móvel (FM), outro problema é a dificuldade de separar substâncias polares nas fases comerciais convencionais (C_8 e C_{18}). Nesse trabalho, foi utilizada a celulose, polímero natural hidrofílico de ampla disponibilidade, modificada com anidridos de cadeia curta tais como anidrido acético e butírico, para produzir um material com maior retenção para compostos polares e com possibilidade de atuação na modalidade de cromatografia líquida de fase aquosa (PALC), a qual requer uma porcentagem de água $> 70\%$ na FM, reduzindo o consumo de solvente orgânico. O polímero acetato butirato de celulose (ABC) foi sintetizado e empregado como recobrimento polimérico das fases estacionárias Si(ABC). As fases foram caracterizadas físico-química e cromatograficamente. Espectros de infravermelho confirmaram a presença do derivado celulósico na fase, através de estiramentos de C=O e C-H característicos do polímero. As micrografias indicaram que mesmo após a imobilização do ABC sobre a sílica, as partículas mantiveram características morfológicas adequadas para empacotamento em colunas de aço inox. A partir das análises cromatográficas, verificou-se que a fase Si(ABC) atua no modo fase reversa separando eficientemente substâncias por mecanismos de interações hidrofóbicas e hidrofílicas devido aos grupos acetato e butirato, modificadores da celulose. A fase Si(ABC) apresentou seletividade estérica intrínseca, que pode ser atribuída à quiralidade da celulose. A aplicação bem sucedida da fase Si(ABC) na separação de uma mistura de composto polares e na separação de fármacos altamente polares com uma alta porcentagem de água em sua FM mostrou a eficácia desse material como fase estacionária para a CLAE na separação de compostos polares. Em conclusão, foi possível empregar a celulose modificada com grupos orgânicos de cadeia curta como revestimento de fase estacionária para cromatografia líquida, apresentando potencialidades de aplicação na pesquisa e na indústria química, além de atuar na modalidade PALC gerando menor quantidade de resíduos orgânicos nas análises.

Palavras-chave: compostos polares, acetato butirato de celulose (ABC), fases estacionárias, PALC, fármacos.

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the widely spread out technique in the academic and industrial environment due to its wide field of application and high capacity to separate and quantify various substances. However, HPLC presents two main problems, the first being the large generation of toxic and difficult-to-treat organic wastes from its mobile phase (FM), another problem is the difficulty of separating polar substances in conventional commercial phases (C_8 and C_{18}). In this work, cellulose, a widely available natural hydrophilic polymer was, modified with short chain organic groups (acetate and butyrate), was used to produce a material with higher retention for polar compounds and separation in the per-aqueous liquid chromatography (PALC) mode, which requires a water content $>70\%$ in mobile phase, reducing the consumption of organic solvent. The cellulose acetate butyrate polymer (ABC) was synthesized and used as the polymer-immobilized Si(ABC) stationary phases. The Si(ABC) phases were physicochemically and chromatographically characterized. Infrared spectra confirmed the presence of the cellulosic derivative on silica, through C=O and C-H stretches characteristic of the polymer. Micrographs indicated that even after the immobilization of ABC on silica, the particles maintained the morphological characteristics suitable for stainless steel column packing. From the chromatographic analysis, it was verified that the Si(ABC) phase acts in reverse phase mode by efficiently separating substances by mechanisms of hydrophobic/hydrophilic interactions due to the acetate and butyrate groups, cellulose modifiers. The Si(ABC) phase presented intrinsic selectivity, which can be attributed to the cellulose polymer. The successful application of the Si(ABC) phase in the separation of a mixture of polar compounds and the separation of highly polar drugs with a high percentage of water in its mobile phase showed the effectiveness of this material as an HPLC stationary phase in the separation of polar compounds. In conclusion, it was possible to use the modified cellulose with small organic groups as a coating of stationary phase for liquid chromatography, presenting potential applications in the research and chemical industry, besides acting in the PALC mode generating less volume of organic residues in the analyzes.

Keywords: HPLC, cellulose acetate butyrate (CAB), stationary phases, PALC, pharmaceutical compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa. _____	14
Figura 2. Estrutura química da celobiose. _____	18
Figura 3. Estrutura química do acetato butirato de celulose, empregado como material de recobrimento das fases estacionárias. _____	19
Figura 4. Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica. _____	25
Figura 5. Micrografias obtidas para as partículas de (A) sílica e de (B) de acetato butirato de celulose. _____	31
Figura 6. Isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio na fase Si(ABC). _____	32
Figura 7. Espectros FT-IR de transmitância (a) da modificação da celulose e (b) da modificação da sílica com o ABC. _____	34
Figura 8. Curvas TGA para (a) o ABC e para (B) comparação de todas as fases Si(ABC). _	36
Figura 9. Curvas de (a) primeira e (b) segunda varreduras de DSC para o acetato butirato de celulose. _____	38
Figura 10. RMN de ^1H do acetato butirato de celulose. _____	39
Figura 11. Cromatograma da separação da mistura teste hidrofóbica pelas fases (a) Si(ABC) #1, fase móvel MeOH:H ₂ O (20:80, v/v), (b) Si(ABC) #2, fase móvel MeOH:H ₂ O (40:60 v/v), (c) Si(ABC) #3, fase móvel MeOH:H ₂ O (20:80, v/v), (d) Si(ABC) #4, fase móvel MeOH:H ₂ O (30:70, v/v). Para todas as fases foram empregadas vazão 0,4 mL min ⁻¹ , detecção UV a 254 nm, temperatura de 25 °C. _____	42
Figura 12. Curva de Van Deemter para a fase Si(ABC) imobilizada termicamente. _____	44
Figura 13. Cromatograma da separação da mistura teste hidrofóbica após 9 análises sequenciais na fase Si(ABC). Condições de análise: Fase móvel MeOH:H ₂ O (30:70, v/v), vazão 0,4 mL min ⁻¹ , detecção UV a 254 nm. _____	45
Figura 14. Gráficos radar das propriedades de retenção das fases estacionárias Si(ABC) e de uma fase C ₁₈ comercial. _____	48
Figura 15. Estruturas moleculares dos compostos: (A) uracila, (B) fenol, (C) benzonitrila, (D) benzilamina e (E) tolueno. _____	49
Figura 16. Cromatograma da separação da mistura de compostos polares pela fase Si(ABC) #4. Condições: fase móvel MeOH:H ₂ O (10:90, v/v); 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção UV 254nm. Coluna: 150 mm × 4,0 mm d.i. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- fenol, 3- benzonitrila, 4- benzilamina e 5- tolueno. _____	50

Figura 17. Estruturas moleculares dos fármacos: (a) cimetidina, (b) famotidina, (c) furosemida, (d) hidroclorotiazida, (e) ranitidina e (f) e sulfasalazina. _____ 51

Figura 18. Cromatograma da separação da mistura de fármacos obtida na fase Si(ABC) #4. Condições: MeOH:H₂O (30:70, v/v); 0,4 mL min⁻¹; detecção UV 220nm. Identificação dos compostos: 1- furosemida, 2- hidroclorotiazida, 3- ranitidina, 4- sulfasalazina, 5- famotidina e 6- cimetidina. _____ 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases Si(ABC) imobilizadas em diferentes temperatura e tempos. _____	23
Tabela 2. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores. _____	26
Tabela 3. Propriedades morfológicas da fase Si(ABC) imobilizada termicamente a 150 °C por 16 h. _____	33
Tabela 4. % de massa perdida na região entre 250 e 450 °C em cada fase Si(ABC) obtidas por análise termogravimétrica. _____	37
Tabela 5. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(ABC). _____	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Acetato butirato de celulose
ASAP	Analizador de área superficial e poros
BET	Método Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Método Barrett-Joyner-Halenda
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLL	Cromatografia líquido-líquido
DSC	Derivative scanning calorimetry (Calorimetria exploratória diferencial)
FE	Fase estacionária
FEQ	Fases estacionárias quimicamente ligadas
FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	Fase reversa
FT-IR	Fourier-transform infrared (Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier)
GS	Grau de substituição
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PALC	Per-aqueous liquid chromatography (Cromatografia líquida em fase aquosa)
RMN	Ressonância magnética de nuclear
Si(ABC)	Fase estacionária de acetato butirato de celulose imobilizado termicamente sobre sílica
TG	Análise termogravimétrica
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Cromatografia líquida de fase normal e de fase reversa	13
1.2 Suporte cromatográfico	14
1.3 Fases estacionárias recobertas com polímeros	15
1.4 Imobilização polimérica por tratamento térmico	17
1.5 Celulose	17
2 OBJETIVOS	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Materiais, reagentes, vidrarias e equipamentos	21
3.2 Síntese do acetato butirato de celulose	22
3.3 Preparação da fase estacionária Si(ABC)	22
3.3.1 Ativação da sílica	22
3.3.2 Preparação da fase estacionária Si(ABC)	22
3.3.3 Imobilização térmica do ABC sobre a sílica	23
3.3.4 Extração do ABC não imobilizado nas partículas de sílica	23
3.3.5 Enchimento da coluna cromatográfica com as fases Si(ABC)	24
3.3.6 Condicionamento das colunas cromatográficas	25
3.4 Avaliação cromatográfica das fases Si(ABC)	25
3.4.1 Curva de van Deemter	26
3.5 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(ABC)	27
3.5.1 Separação de uma mistura de fármacos	27
3.5.2 Separação da mistura compostos polares	27
3.6 Caracterização morfológica e estrutural da fase Si(ABC)	27
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura	27
3.6.2 Análise de poros e área superficial específica	28
3.6.3 Análise termogravimétrica	28
3.6.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	29
3.6.5 Calorimetria diferencial de varredura	29
3.6.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1 Microscopia eletrônica de varredura	31
4.2 Área superficial específica e estrutura de poros	32
4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	33
4.4 Análise termogravimétrica	35
4.5 Calorimetria diferencial de varredura	38
4.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H	39
4.7 Avaliação cromatográfica das fases Si(ABC)	41
4.7.1 Separação da mistura teste hidrofóbica	41
4.7.2 Curva de van Deemter	43
4.7.3 Estudo da repetibilidade do tempo de retenção na fase Si(ABC)	44
4.7.4 Protocolo de Tanaka e colaboradores	45
4.8 Separação de uma mistura de compostos polares	49
4.9 Separação de mistura de fármacos	50
5 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Vários métodos de separação têm sido empregados durante quase toda a história. Processos como remoção de contaminantes por filtração em areias ou de excesso de sal por contato com certas folhas encontram-se descritas na Bíblia e em trabalhos gregos e egípcios antigos. Outros métodos de separação, como destilação, extração por solvente e amalgamação, foram empregados pelos alquimistas. Os efeitos resultantes da “adsorção” foram descritos no século XVI para um processo de preparação de vinho branco a partir de vinho tinto. No século XIX, alguns cientistas aplicaram diferentes sólidos para a “filtração”, remoção de alguns componentes ou fracionamento de líquidos, enquanto outros fizeram esses fracionamentos em papel (COLLINS, 2009).

O século XX tem sido chamado de “o século da cromatografia”, uma vez que essa técnica foi altamente importante no desenvolvimento de várias áreas das ciências. No momento, existem indicações que as cromatografias e suas técnicas relacionadas também proporcionarão relevantes contribuições neste século XXI (COLLINS, 2009).

É senso comum entre os historiadores da ciência, creditar o mérito da invenção da cromatografia ao botânico russo Michael S. Tswett, tendo como marco um relatório publicado em 1903. No entanto, são muitos os registros de fenômenos relacionados à cromatografia anteriores a Tswett. Provavelmente, a primeira observação de utilização destes fenômenos seja do historiador romano Caio Plínio Segundo no ano de 77 da nossa era. Conhecido como Plínio, o Velho, era um militar romano naturalista, que devido a sua dedicação ao entendimento dos fenômenos naturais, acabou falecendo por inalação de gases tóxicos quando tentou observar a erupção do vulcão Vesúvio, no ano 79, em Pompéia (PACHECO, *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da cromatografia líquida moderna como se conhece hoje iniciou-se na década de 1960 por dois grupos de pesquisa: Csaba Horváth, nos Estados Unidos, e Josef Huber, na Europa. Esses pesquisadores conduziram estudos voltados para o desenvolvimento de um sistema instrumental de cromatografia líquida hoje conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência (NAZARIO; LANÇAS, 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é nos dias de hoje, a técnica analítica de separação mais utilizada. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros

campos da ciência. (TONHI, *et al.*, 2002). O desenvolvimento de fases estacionárias para CLAE vem possibilitando o aumento do número de compostos analisados pela CLAE.

1.1 Cromatografia líquida de fase normal e de fase reversa

A forma mais tradicional da cromatografia líquida empregava uma fase estacionária polar como, por exemplo, a sílica e a alumina, e uma fase móvel apolar composta basicamente de um hidrocarboneto alifático, juntamente com pequenas quantidades de um hidrocarboneto clorado, como por exemplo, o clorofórmio ou um álcool, como o isopropanol. Hoje esta modalidade de cromatografia é denominada como cromatografia líquida de fase normal (CLAE-FN) e o seu princípio de separação se baseia na interação dos grupos funcionais dos respectivos analitos com os sítios polares de adsorção da sílica cromatográfica ou de grupos polares ligados ou adsorvidos na sílica. Devido a uma série de limitações, em especial retenções irreversíveis de compostos polares nas fases estacionárias, a CLAE-FN deu lugar a cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR) (VIGNA, 2004).

Estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa. Sistemas de CLAE-FR consistem em uma fase estacionária (FE) de menor polaridade que a fase móvel. Convencional e comercialmente, as fases estacionárias da CLAE-FR são constituídas de moléculas orgânicas alifáticas com 8 ou 18 carbonos (C_8 ou C_{18} , respectivamente) ligadas quimicamente, por ligações covalentes (Si-O-C) a um suporte inorgânico sólido, de alta regularidade e pureza. Estas FE apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, com a presença de água como um de seus solventes; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez nas análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI, *et al.*, 2002).

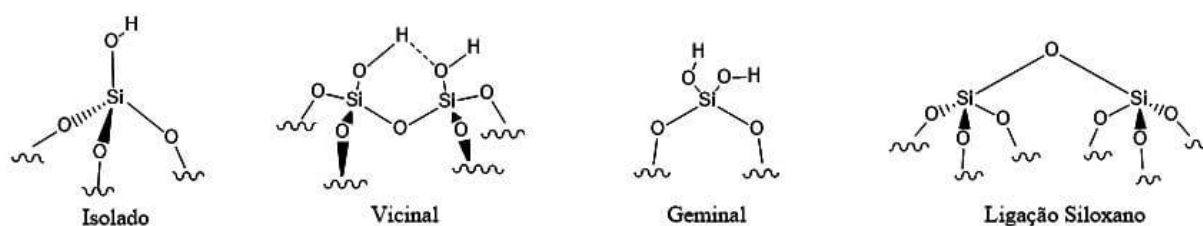
A ampla aplicabilidade da CLAE-FR foi o que impulsionou e continua impulsionando as pesquisas em busca do aprimoramento desta técnica, principalmente referente ao desenvolvimento de novas fases estacionárias (MALDANER, COLLINS; JARDIM, 2010).

1.2 Suporte cromatográfico

Um bom suporte cromatográfico para CLAE deve possuir algumas características fundamentais como ser mecanicamente estável, ou seja, suportar altas pressões exigidas no sistema CLAE; possuir grande concentração de grupos ativos na superfície, a fim de promover melhor desempenho cromatográfico; ser inerte em relação aos compostos a serem analisados (NAZARIO; LANÇAS, 2013); possuir área superficial maior que $10 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e diâmetro de poros de 5 a 100 nm (MEYER, 2010).

Na CLAE-FR, os suportes cromatográficos podem ser baseados em polímeros inorgânicos, orgânicos ou híbridos. Entre os polímeros inorgânicos pode-se destacar o óxido de silício (sílica), que é o suporte mais utilizado nas separações cromatográficas. A sílica apresenta-se como unidades SiO_2 aleatórias, unidas por ligações siloxanos (Si-O-Si) contendo em sua superfície grupos silanóis (NAZARIO; LANÇAS, 2013). Dentre as principais características da sílica, podem ser destacadas: partículas pequenas e esféricas disponíveis em uma ampla variedade de diâmetro (1,7 a 20 μm , com distribuição de tamanho reduzida) e tamanhos de poros (5 a 400 nm); partículas altamente porosas com grande área superficial (50 a 1000 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$); força mecânica (elevada rigidez) adequada para resistir às altas pressões necessárias em CLAE, e; facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos silanóis, muito reativos (ZHURAVLEV, 2000). A sílica apresenta três tipos de grupos silanóis em sua superfície como mostrado na Figura 1.

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



Fonte: Próprio autor.

As propriedades que fazem da sílica um óxido altamente interessante para a cromatografia líquida são (i) a alta atividade química da sua superfície, essa atividade depende da concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis, e não das ligações de siloxano que apresentam maior estabilidade, e (ii) pela estrutura porosa da sílica (FARIA, 2006).

A concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis é altamente dependente do tipo de pré-tratamento (ácido, básico ou térmico) pelo qual a sílica foi submetida. Em especial tratamentos térmicos foram amplamente discutidos por (ZHURAVLEV, 2000), que sugeriu um modelo físico-químico para a concentração de grupos silanóis da superfície da sílica. Em linhas gerais o modelo descreve as etapas ocorridas a partir da desidratação até uma completa desidroxilação da sílica, indicando os principais tipos de silanóis presentes em cada estágio do modelo. Uma informação importante abstraída do modelo de Zhuravlev é a faixa de temperatura em que a superfície apresenta um grau máximo de hidroxilação, 25 a 190 °C, sob vácuo (ZHURAVLEV, 2000).

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 que não ocorra degradação e a segunda refere a presença dos grupos silanóis residuais, os quais causam a assimetria de pico quando amostras básicas são analisadas (SILVA, *et al.*, 2004).

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 sílica. Como consequência, o leito cromatográfico dentro da coluna é alterado, resultando em baixas eficiências e alargamento frontal de pico (SILVA, *et al.*, 2004).

Outra limitação da sílica como suporte cromatográfico é que apenas 50 % dos grupos silanóis são capazes de se ligar quimicamente aos modificadores orgânicos tradicionais (C_8 ou C_{18} , por exemplo) na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR, por problemas de impedimento estérico devido ao grande volume das moléculas C_{18} , restando um grande número de silanóis residuais que podem alterar o mecanismo de separação da fase estacionária (NAHUM; HORVARTH, 1981), por interagirem fortemente com compostos básicos. Uma alternativa é a imobilização de polímeros na superfície do suporte cromatográfico.

1.3 Fases estacionárias recobertas com polímeros

A preparação de fases reversas através da deposição e imobilização de polímeros sobre a superfície da sílica cromatográfica foi inicialmente desenvolvida por (BIEN-

VOLGELSANG, *et al.*, 1984) 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 cromatográfica (SILVA, *et al.*, 2004).

Atualmente a preparação destas fases estacionárias recobertas tem sido bem sucedida, combinando a resistência mecânica da matriz inorgânica com a seletividade e inércia química dos polímeros orgânicos. As principais vantagens das fases recobertas com polímeros sobre as quimicamente ligadas são: maior recobrimento dos sítios ativos do suporte e a possibilidade de ajuste mais fino da seletividade da fase estacionária pela escolha do polímero apropriado (DIB; FARIA, 2014).

A forma mais comum de recobrimento polimérico do suporte de sílica é realizada através da deposição de uma camada polimérica pré-sintetizada sobre a sua superfície. Neste caso, o polímero pré-sintetizado é dissolvido em solvente apropriado e adicionado ao suporte, recobrindo-o apenas por mecanismos de adsorção e, posteriormente, evapora-se o solvente, obtendo um material com polímero fracamente adsorvido na superfície do suporte (JARDIM, COLLINS; COLLINS, 2004).

Posteriormente ao recobrimento polimérico, pode-se realizar alguns processos para a imobilização (fixação mais forte) do polímero sobre o suporte, como por exemplo, tratamento térmico (CARVALHO, 2017), irradiação por micro-ondas (LOPES, COLLINS; JARDIM, 2004) (CARVALHO, SILVA; FARIA, 2016) e por irradiação gama (FARIA, 2006) (FARIA, COLLINS; COLLINS, 2007). O tratamento térmico se destaca por causa da simplicidade de uso e da instrumentação necessária. Além disso, não são necessários reagentes para fixar a camada polimérica na sílica partículas (DIB; FARIA, 2014).

A quantidade de polímero imobilizado afeta a eficiência da fase estacionária na separação de compostos, pois uma quantidade maior do polímero imobilizado sobre o suporte irá contribuir para uma maior proteção dos grupos ativos superficiais (silanóis) contra interações indesejáveis, porém uma quantidade muito elevada de polímero poderá bloquear os poros do suporte, deixando o processo de transferência de massa mais lento (BOTTOLI, *et al.*, 2002).

1.4 Imobilização polimérica por tratamento térmico

O tratamento térmico é uma fonte de energia amplamente usada em diversos estudos e o aquecimento da amostra ocorre por condução de calor, isto é, inicialmente o recipiente contendo a amostra é aquecido e, em seguida, ocorre a transferência do calor para a amostra. O tratamento térmico tem sido utilizado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes de sílica, auxiliando no processo de auto-imobilização. A auto-imobilização é um processo lento à temperatura ambiente, sendo necessário um considerável período, que varia dependendo da sílica utilizada, para que haja o rearranjo das moléculas de polímero em uma monocamada estável, de forma irreversível (VIGNA, 2004).

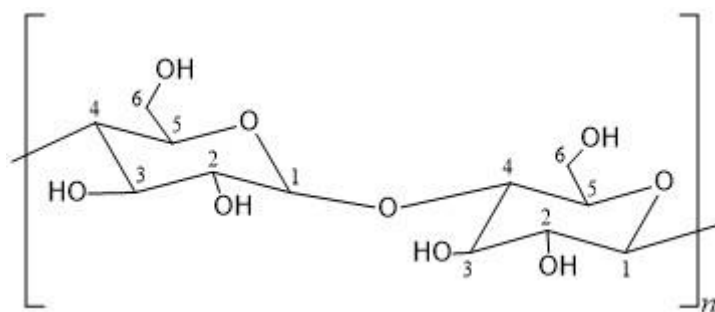
Uma das principais vantagens da imobilização térmica é a facilidade do emprego da técnica, uma vez que necessita apenas de um forno simples (como a estufa ou a mufla) com controle da temperatura. A temperatura e o tempo de exposição do material são as variáveis principais a serem estudadas. Pequenas variações na temperatura ou no tempo não afetam de forma significativa a resposta, mostrando que além de simples o tratamento térmico é um procedimento robusto para a imobilização de polímeros orgânicos em óxidos inorgânicos (BOTTOLI, *et al.*, 2002) (FARIA, 2006).

Neste trabalho é estudado um polímero biodegradável, natural com ampla disponibilidade no meio ambiente e com características hidrofílicas que pudesse recobrir a sílica resultando em uma fase estacionária capaz de separar substância difíceis de serem analisadas nas fases comerciais e com uma elevada porcentagem de água em sua FM.

1.5 Celulose

A celulose é uma das substâncias orgânicas mais abundantes no planeta, sendo constituída principalmente por fibra vegetal, ela pode ser encontrada em diferentes espécies de plantas verdes, fungos e protozoários (DONINI, *et al.*, 2010). A celulose microcristalina pode ser obtida a partir da celulose natural após purificação, e fragmentação física das paredes celulares das fibras das plantas. A celulose possui unidades repetidas do monômero celobiose, representada pela Figura 2, que apresenta um arranjo linear de unidades de D-glicose conectadas por ligação β -1,4: $[C_6H_{10}O_5]_n$ e possui muitos grupos hidroxílicos disponíveis.

Figura 2. Estrutura química da celobiose.



Fonte: Próprio autor.

A celulose possui características interessantes do ponto de vista de sua utilização, tais como: hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, quiralidade e facilidade de modificação de seus grupos hidroxilas (WEN, *et al.*, 2017). No entanto, o uso da celulose pura como recobrimento celulósico apresenta algumas restrições, como por exemplo, sua baixa solubilidade em solventes orgânicos, o que dificultaria o recobrimento do óxido inorgânico do suporte cromatográfico na forma de uma monocamada fina e homogênea, sua modificação pode resultar em materiais poliméricos (derivados celulósicos) com características interessantes do ponto de vista da aplicabilidade e seletividade da celulose, como fase estacionária para CLAE (VIEIRA, 2018).

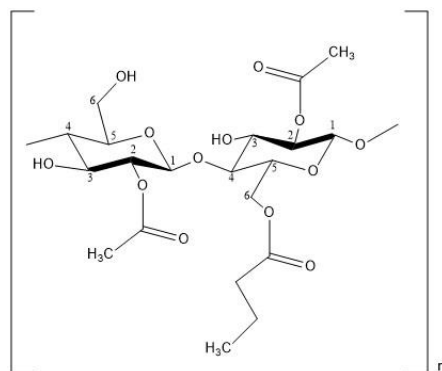
A primeira fase estacionária derivada de polissacarídeo, o triacetato de celulose microcristalina, foi desenvolvida por (HESSE; HAGEL, 1973). Essa fase estacionária apresentou boa habilidade de separação enantiosseletiva e foi usada para separação de muitos compostos alifáticos e aromáticos. (YOHIO, *et al.*, 1984) solubilizaram o triacetato de celulose e o adsorveram em sílica macroporosa. Essa fase mostrou uma capacidade de reconhecimento quiral completamente distinta da fase preparada por Hesse e Hagel, sendo observada inversão na ordem de eluição de enantiômeros (LOURENÇO, CASSIANO; CASS, 2010).

Os derivados de celulose são, provavelmente, as fases estacionárias quirais (FEQ) mais frequentemente utilizadas em separações preparativas, em virtude da sua extensa faixa de aplicações e/ou sua elevada capacidade de adsorção (GONÇALVES, 2005).

O material polimérico escolhido para o trabalho foi um derivado celulósico, o acetato butirato de celulose (ABC), cuja estrutura química se encontra na Figura 3. O acetato butirato de celulose é um polímero termoplástico derivado da esterificação da celulose, utilizado em filmes fotográficos e materiais de revestimentos (HUANG *et al.*, 2011). O motivo de sua escolha foi devido ao curto comprimento das cadeias carbônicas modificadoras da celulose,

possibilitando menor hidrofobicidade da fase estacionária e, provavelmente, melhor interação com compostos polares devido à maior contribuição da hidrofiliicidade da celulose.

Figura 3. Estrutura química do acetato butirato de celulose, empregado como material de recobrimento das fases estacionárias.



Fonte: Próprio autor.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos otimizar a preparação de uma fase estacionária para CLAE baseada na imobilização térmica de uma camada de acetato butirato de celulose (ABC) sobre partículas de sílica e avaliar suas características e potencialidade na separação de substâncias, empregando menor quantidade de solventes orgânicos na fase móvel. Para alcançar esses objetivos, algumas etapas foram realizadas:

- i. Preparar o derivado ABC a partir da esterificação de celulose microcristalina com uma mistura de anidrido acético e anidrido butírico;
- ii. Otimizar a imobilização térmica do ABC sobre a superfície e poros de sílica cromatográfica, em termos de tempo e temperatura;
- iii. Caracterizar morfológica e físico-quimicamente a nova fase estacionária, Si(ABC), e associar os resultados aos requisitos para materiais de separação em cromatografia;
- iv. Caracterizar cromatograficamente a fase Si(ABC) através da separação de misturas testes padrão, para determinação das suas propriedades de retenção, e;
- v. Aplicar a fase Si(ABC) produzida na separação de algumas misturas de compostos polares.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais, reagentes, vidrarias e equipamentos

Para o preparo do acetato butirato de celulose (ABC) foram utilizados agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 753A, São Paulo, Brasil); barra magnética; funis de vidro; béqueres de 25 e 100 mL; balança eletrônica com precisão de 0,0001 g (Acculab, Bradford, PA, EUA); ultrapurificador de água (MegaPurity, MA, Billerica, EUA), sistema de filtração de fase móvel; funil de placa sinterizada; bomba de vácuo e kitassato de 500 mL.

Para o preparo da fase móvel, foi utilizada uma membrana de nylon (Millipore, Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 μm e diâmetro de 45 mm; e banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil).

Para o preparo das fases Si(ABC) foram utilizados béqueres de 10, 25 e 50 mL; micropipetas; pipetas de Pasteur; espátulas; provetas de 10, 25 e 50 mL; dessecador; tubos de ensaio com tampa rosqueável de 20 mL; funis de vidro; centrífuga (Celm, modelo combate, São Caetano do Sul, Brasil) e mufla (JUNG, Blumenau, Brasil); sílica cromatográfica (partículas de diâmetro médio de 5 μm e diâmetro nominal de poros de 100 Å) (Microsorb, Palo Alto, CA, EUA); e metanol grau cromatográfico com 99,5 % de pureza (JT Baker, Xalostoc, México).

Para análise das misturas de compostos pelas fases estacionárias produzidas nesse trabalho foram realizadas medidas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modular da marca Varian ProStar[®] (Palo Alto, CA, EUA), com sistema binário de bombeamento de solventes modelo Prostar 210 pump, dectetor UV (ultravioleta) a 254 nm modelo ProStar 325; injetor manual Reodhyne[®] modelo 7725i. e pelo Cromatógrafo a líquido Waters e2695, com sistema de detecção de arranjo de diodos modelo 2998 PDA, gerenciado pelo software Empower3[®]. Para a aplicabilidade foram adquiridos os fármacos furosemida, hidroclotiazida, ranitidina, sulfasalazina, famotidina e cimetidina todos com grau de pureza farmacêutico.

Para o preparo do acetato butirato de celulose foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: celulose microcristalina (Synth, Diadema, Brasil) ácido acético glacial, grau cromatográfico 99,7 % (Dinâmica, Diadema, Brasil); ácido sulfúrico PA ACS (Panreac, Barcelona, Espanha); anidrido acético 99,4 % (Neon Comercial LTDA, São Paulo, Brasil), anidrido butírico 97,0 % (Lab Líder, Ribeirão Preto, Brasil). Para teste de solubilidade do ABC

foram utilizados diclorometano PA ACS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA); THF PA (Dinâmica); acetona PA (Dinâmica); tolueno PA (Sigma-Aldrich).

3.2 Síntese do acetato butirato de celulose

Para a síntese do acetato butirato de celulose, aproximadamente 1,000 g de celulose microcristalina foi dispersa em 34,0 mL de ácido acético glacial e 0,08 mL de ácido sulfúrico concentrado sob agitação por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 16,0 mL de anidrido butírico e 16,0 mL de anidrido acético, mantendo a mistura reacional sob agitação branda durante 24 horas. O acetato butirato de celulose foi formado e dissolvido no meio, sendo, após 24 h de reação, precipitado a partir da adição de água destilada. O precipitado foi filtrado e lavado até que a água residual apresentasse um valor de pH próximo a 5. O derivado foi colocado em um vidro de relógio e tampado com papel filme, contendo pequenos furos e levado à capela para a evaporação total solvente, sem qualquer aquecimento ou agitação. Após a secagem, o ABC foi armazenado até o momento de seu uso para a preparação da fase Si(ABC) (ANDRADE, 2015).

3.3 Preparação da fase estacionária Si(ABC)

3.3.1 Ativação da sílica

Inicialmente, os sítios ativos das partículas de sílica cromatográfica foram ativados através da dessorção de moléculas de água adsorvidas em sua superfície. Foi pesado 1,000 g de sílica cromatográfica em um béquer, que foi coberto com papel alumínio previamente furado, para liberação do vapor de água. Em seguida, a sílica foi aquecida a uma temperatura de 140 °C por 12 h em uma mufla. Após esse período, o béquer contendo a sílica ativada foi transferido para um dessecador sob vácuo e deixado em repouso até alcançar a temperatura ambiente.

3.3.2 Preparação da fase estacionária Si(ABC)

Adicionaram-se 10 mL de clorofórmio a um béquer de 25 mL e uma barra magnética pequena, deixando sob agitação branda. Foram adicionados 0,70 g de acetato butirato de celulose, com auxílio de uma espátula pequena (pesou-se previamente a massa do acetato butirato de celulose - ABC), ao béquer contendo o clorofórmio sob agitação. A solução foi

deixada sob agitação por 5 min para solubilizar completamente o ABC no clorofórmio. Adicionou-se cerca de 1,0 g de sílica, previamente ativada a 140 °C por 12 h, ao béquer contendo a solução do ABC. A suspensão da sílica em acetato butirato de celulose foi deixada sob agitação branda por 2 h 30 min. Em seguida, o béquer foi retirado da agitação e coberto com uma folha de papel alumínio previamente furada. O béquer foi deixado em repouso por 5 dias para que todo o solvente fosse evaporado à temperatura ambiente. Ao final desta etapa obteve-se um material seco denominado de fase sorvida - Si(ABC).

3.3.3 Imobilização térmica do ABC sobre a sílica

Após a obtenção da fase estacionária sorvida de Si(ABC) completamente seca, o material foi revolvido com o auxílio de uma espátula de forma a descompactar o sólido no béquer. Logo em seguida, o béquer foi levado para a mufla ajustando a temperatura e o tempo desejado, conforme indicado na Tabela 1. Após essa etapa, obteve-se a fase Si(ABC) imobilizada termicamente.

Tabela 1. Fases Si(ABC) imobilizadas em diferentes temperatura e tempos.

Fases Si(ABC)	Temperatura de imobilização (°C)	Tempo de imobilização (h)
I	100	8
II	150	8
III	100	16
IV	150	16

3.3.4 Extração do ABC não imobilizado nas partículas de sílica

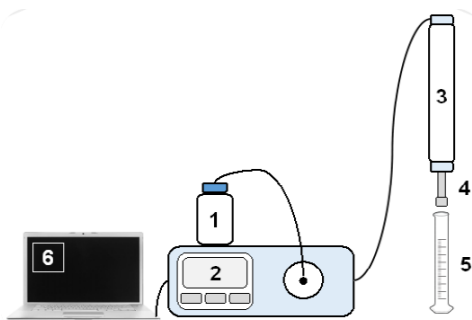
Uma pequena quantidade do polímero ABC não é imobilizada na superfície do suporte da sílica, portanto, esse resíduo deve ser removido do material para que não seja liberado dentro do cromatógrafo durante a passagem contínua de fase móvel. Para isso, o material sólido foi adicionado em quantidades, aproximadamente iguais, a tubos de ensaio previamente limpos e secos. A cada tubo foram adicionados aproximadamente 3 mL de clorofórmio e agitado com o auxílio de um agitador vórtex por 30 s. Os tubos foram levados à centrifuga por 5 min a 2500 rpm, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 3 mL de uma solução clorofórmio:metanol (1:1, v/v) a cada tubo e repetiu-se o procedimento. Em seguida, realizou-

se o procedimento novamente empregando o metanol como solvente de limpeza. O material sólido resultante foi seco a 100 °C em estufa por 1 h.

3.3.5 Enchimento da coluna cromatográfica com as fases Si(ABC)

Para o enchimento de colunas cromatográficas com as fases Si(ABC), foram preparadas suspensões do Si(ABC) em clorofórmio. As suspensões consistiam em aproximadamente 1 g de Si(ABC) em 15 mL de clorofórmio filtrado. As suspensões foram agitadas em vórtex por 1 min e deixadas em banho ultrassom por 10 min, a fim de impedir a aglomeração de partículas. Após esse período, as suspensões foram transferidas para o sistema de enchimento de colunas, apresentado na Figura 4. Resumidamente, o reservatório do solvente propulsor (1) foi preenchido com metanol previamente filtrado. Em seguida, a pressão da bomba (2) foi ajustada para um valor máximo de 9.000 psi, com vazão de solvente de 24 mL min⁻¹. O reservatório de suspensão (3) contendo a coluna cromatográfica de 50 milímetros de comprimento (4), devidamente acoplada à sua extremidade foi preenchido com a suspensão Si(ABC):Clorofórmio. O volume do reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio) devidamente filtrado. Fechou-se a extremidade superior do reservatório de solvente pelo qual foi adicionada a FE. Com o sistema todo fechado, a bomba foi ligada através de acionamento no software Quick-set Pump® (6), que bombeou metanol para o sistema de enchimento, impulsionando a fase Si(ABC) para o interior da coluna cromatográfica. A fase Si(ABC) ficou retida na coluna devido à presença de um filtro (diâmetro de poro de 2 µm) na extremidade inferior. O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de aproximadamente 80 mL de solvente (5), que foram recolhidos em uma proveta de 100 mL, colocada logo abaixo do sistema de enchimento. Esse volume é equivalente a duas vezes a capacidade do reservatório da suspensão. A manutenção da pressão durante todo o procedimento de enchimento da coluna foi necessária para produzir um recheio homogêneo e com boa compactação. Depois de terminado o enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal.

Figura 4. Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica.



Fonte: Próprio autor.

3.3.6 Condicionamento das colunas cromatográficas

Após o enchimento, as colunas cromatográficas foram conectadas ao cromatógrafo a líquido, passando fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50 (v/v) por aproximadamente 2 h. Nessa etapa apenas uma das extremidades das colunas foi acoplada ao cromatógrafo a líquido, nesse caso, na conexão das bombas cromatográficas, enquanto a outra extremidade foi ligada diretamente a um descarte. Esse procedimento foi importante, uma vez que resíduos da etapa de enchimento sejam removidos das colunas e causem entupimento da cela de detecção.

3.4 Avaliação cromatográfica das fases Si(ABC)

A avaliação cromatográfica da fase Si(ABC) foi realizada através de parâmetros cromatográficos de uma mistura teste de compostos padrão. Os compostos presentes na mistura foram detectados no comprimento de onda de 254 nm e o volume de amostra injetado foi de 20 µL. A mistura padrão utilizada foi composta por: benzeno, benzonitrila, naftaleno, tolueno e uracila. A ordem de eluição dos compostos desta mistura indica o comportamento/modo que governa a separação pela fase Si(ABC).

Para realizar uma caracterização cromatográfica mais completa da fase Si(ABC), também foram realizadas análises das misturas do Protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA, *et al.*, 1989), pelo qual são determinadas propriedades de retenção da fase estacionária a partir da separação dos compostos em cada uma das misturas analisadas. O protocolo é constituído por quatro misturas distintas que são analisadas em diferentes condições de fase móvel. As misturas e suas respectivas fases móveis são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores.

Misturas	Compostos	Condições de análise	Propriedades medidas
MT-I	Uracila, Butilbenzeno, Pentilbenzeno, O-terfenila e Trifenileno	MeOH:H ₂ O, 80:20 v/v; detecção UV 254nm, temp 25°C	Hidrofobicidade Seletividade metilênica Seletividade estérica
MT-II	Uracila, Cafeína e Fenol	MeOH:H ₂ O, 30:70 v/v; detecção UV 254nm, temp 25°C	Capacidade de ligação de hidrogênio
MT- III	Uracila, Benzilamina e Fenol	MeOH:tampão fosfato pH 7,60, 30:70 v/v; detecção UV 254nm, temp 25°C	Capacidade de troca iônica total
MT- IV	Uracila, Benzilamina e Fenol	MeOH:tampão fosfato pH 2,70, 30:70 v/v; detecção UV 254nm, temp 25°C	Capacidade de troca iônica em meio ácido

3.4.1 Curva de van Deemter

Normalmente, a eficiência de uma coluna usada em CLAE é expressa em número de pratos por metro (N/m), pois, desta forma, é possível comparar a eficiência cromatográfica de colunas de diferentes comprimentos. A medida da altura de um prato (H) é uma outra forma de se comparar o desempenho de colunas cromatográficas diferentes. H pode ser obtida de acordo com a Equação 1 (MEYER, 2010).

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde L é o comprimento e N o número de pratos da coluna.

A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima de fase móvel, relacionada à velocidade linear, que resulta em um valor máximo de eficiência de coluna ou em um valor mínimo de H (MEYER, 2010). Nesse estudo, para determinar a vazão ótima da fase móvel a ser eluída pela fase Si(ABC), foi utilizada a fase Si(ABC) #4 como recheio de uma coluna 50 x 4 mm d.i., separando a mistura teste padrão composta por uracila, benzeno, benzonitrila, tolueno e naftaleno. A fase móvel empregada foi composta de MeOH:H₂O na proporção 30:70 (v/v), variando a vazão de 0,1 até 1,2 mL min⁻¹ e detecção UV a 254 nm.

3.5 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(ABC)

3.5.1 Separação de uma mistura de fármacos

A aplicabilidade da fase Si(ABC) foi avaliada na separação de uma mistura contendo os fármacos cimetidina, famotidina, ranitidina, furosemida, hidroclorotiazida e sulfasalazina. Estes compostos possuem baixa retenção nas fases estacionárias comerciais convencionais (C_8 e C_{18}), tornando-se difíceis de serem analisados pela CLAE-FR. Nesse estudo foi utilizada a fase Si(ABC)#4 como recheio para uma coluna de 50 x 4 mm d.i. para a separação dos fármacos. A fase móvel empregada foi MeOH:H₂O na proporção 30:70 (v/v), com uma vazão de 0,4 mL min⁻¹ e detecção UV a 220 nm. As soluções padrões individuais dos fármacos foram injetados separadamente para a identificação dos picos nos cromatogramas a partir da comparação dos tempos de retenção dos compostos.

3.5.2 Separação da mistura compostos polares

A aplicabilidade da fase Si(ABC) foi avaliada também na separação de uma mistura contendo uracila, benzonitrila, fenol, benzilamina e tolueno, esses compostos não são bem separados nas fases comerciais convencionais por apresentarem elevada polaridade e baixa retenção em fases estacionárias altamente hidrofóbicas. Nesse estudo foi utilizada a fase Si(ABC)#4 como recheio para uma coluna de 150 x 4 mm d.i. Foi empregada uma FM de MeOH:H₂O na proporção 10:90 (v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção UV a 254 nm.

3.6 Caracterização morfológica e estrutural da fase Si(ABC)

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação morfológica das partículas de sílica com acetato butirato de celulose termicamente imobilizada foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesta técnica, as partículas foram fixadas em porta-amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As imagens das partículas de Si(ABC) foram obtidas

com diferentes ampliações. As medidas foram realizadas na Faculdade de Engenharia Química da UFU, empregando um microscópio eletrônico JEOL modelo JS-6360/LV (Tóquio, Japão).

3.6.2 Análise de poros e área superficial específica

As amostras de Si(ABC) foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros (ASAP). Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. Antes das medidas, as amostras foram degaseificadas a 100 °C por 24 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (GREGG; SING, 1982), a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total dos poros foi determinado pelo método BJH do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido nos poros do material na p/p_0 de 0,995 para o volume de adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 2.

$$d_p = \frac{4 V_p}{S_{BET}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que: d_p = diâmetro de poros (nm); V_p = volume de poros ($\text{nm}^3 \text{ g}^{-1}$) e S_{BET} = área superficial específica ($\text{nm}^2 \text{ g}^{-1}$) obtida pelo método BET.

Esta medida foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

3.6.3 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do ABC foi avaliada por análise termogravimétrica (TG, do inglês, *thermogravimetric analysis*), na qual cerca de 5 mg de amostra foram colocados em uma microbalança no analisador térmico e submetidos a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} . As medidas foram realizadas sob atmosfera inerte em um analisador termogravimétrico modelo TGA 55 Discovery, marca TA Instruments, relacionando a perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal – LEMUP/UFU.

3.6.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O polímero ABC e as fases estacionárias Si(ABC) imobilizadas sob diferentes condições experimentais foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR, do inglês *Fourier-Transform Infrared*). Cerca de 5 mg do polímero ABC ou das fases Si(ABC) imobilizadas termicamente foram empregados na preparação de pastilhas, na proporção 1:100 (m/m), de KBr sólido. A mistura foi prensada em um porta-amostra de maneira apropriada e a pastilha formada foi levada a um espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão). As medidas foram realizadas na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e uma taxa de 32 varreduras por minuto no laboratório de instrumentação do curso de Química, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da UFU.

3.6.5 Calorimetria diferencial de varredura

A análise térmica foi realizada em um calorímetro diferencial de varredura (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) da TA Instruments modelo Q25 Discovery (New Castle, DE, EUA) a uma taxa de aquecimento e resfriamento de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} . Em panelas de alumínio hermeticamente fechadas, foram pesados cerca de 10 mg de Si(ABC). A panela com a amostra foi colocada na célula DSC sendo subsequentemente submetida aos ciclos de aquecimento. O primeiro ciclo de aquecimento foi de 25 até 140 $^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, a amostra foi resfriada. O segundo ciclo de aquecimento ocorreu até 140 $^{\circ}\text{C}$. Estas medidas foram realizadas no LEMUP/UFU.

3.6.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A caracterização estrutural do acetato butirato de celulose para confirmação da modificação da celulose com os grupos acetato e butirato foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H em um espectrômetro Bruker AscendTM 400 (400 MHz) (Karlsruhe, Alemanha). As amostras foram preparadas pela dissolução de 20 mg do ABC, previamente seco, em 0,5 mL de CDCl_3 . Os deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H foram definidos pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0 (zero) ppm. O espectro unidimensional de RMN de ^1H foi realizado à temperatura ambiente (27 $^{\circ}\text{C}$) com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 128 transientes em uma janela espectral de 16

ppm e 32k de número de pontos. Esta medida foi realizada no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

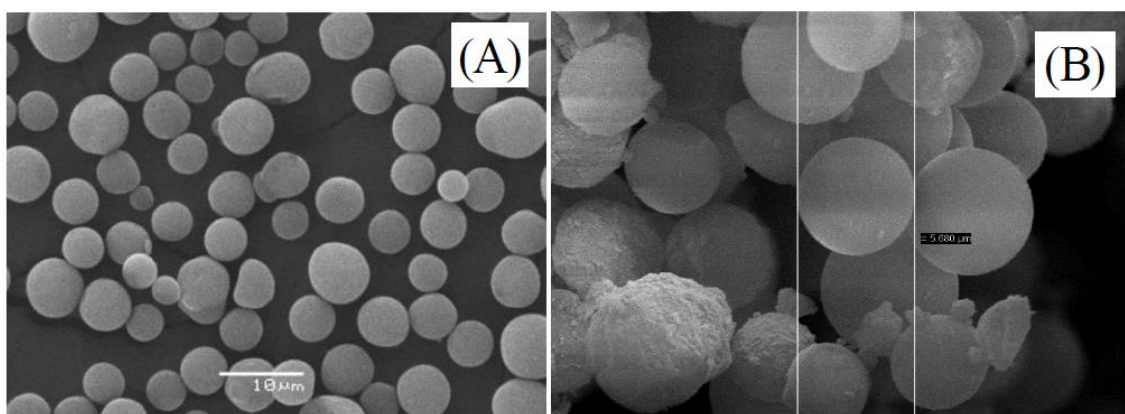
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase Si(ABC) foi preparada e submetida à caracterização físico-química e morfológica. Os principais objetivos dessa caracterização foram: confirmar a obtenção do acetato butirato de celulose, confirmar sua imobilização nas partículas de sílica e avaliar se suas características são compatíveis com o sistema cromatográfico a líquido. As fases Si(ABC) foram caracterizadas quanto a morfologia (MEV e ASAP), propriedades térmicas (TGA e DSC) e estrutura (FT-IR e RMN de ^1H).

4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica da fase Si(ABC) foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. As características morfológicas do material são importantes, pois a cromatografia líquida emprega colunas recheadas com fases estacionárias particuladas e o melhor desempenho é alcançado quando o empacotamento da coluna é realizado em seu grau máximo, ou seja, sem muitos espaços vazios internos à coluna. Essa condição é alcançada com partículas regulares e uniformes, individualmente dispostas dentro da coluna. Uma micrografia representativa da fase Si(ABC) imobilizada termicamente e outra do suporte de sílica pura são apresentadas na Figura 5.

Figura 5. Micrografias obtidas para as partículas de (A) sílica e de (B) da fase Si(ABC)#4.



Fonte: Próprio autor.

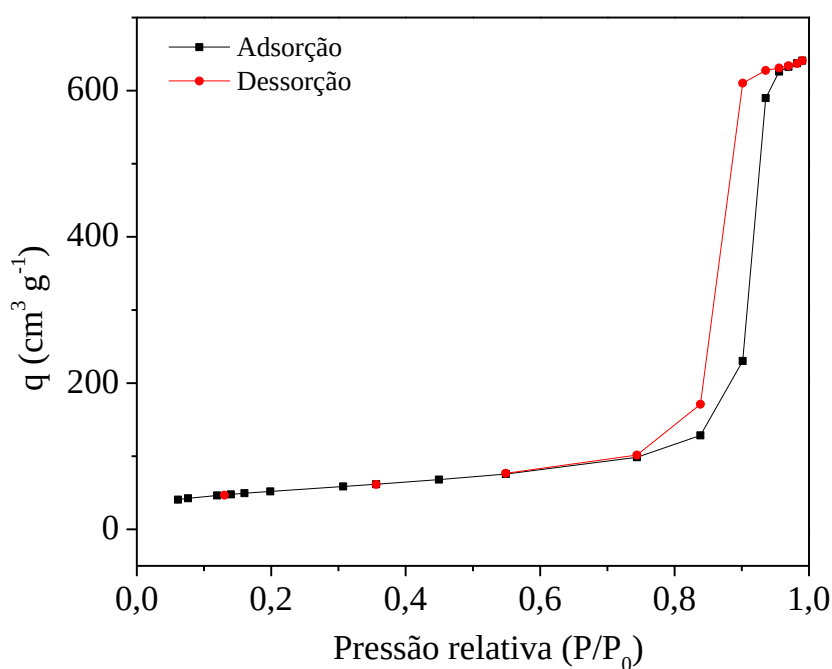
Através das micrografias da Figura 5b, observa-se a presença do ABC sobre a superfície da sílica formando uma camada não regular, porém algumas partículas aparentemente não apresentaram modificação com o ABC, fazendo com que as partículas da fase Si(ABC) não

sejam homogêneas. No entanto, em uma pequena massa de material (uma porção de partículas) a porcentagem de ABC se apresenta homogênea (repetibilidade de resposta do teor de polímero). Essa irregularidade das partículas pode estar associada a deposição do ABC na forma de gotas inicialmente, que se espalham com o tempo sobre a superfície da partícula, formando uma monocamada. Como o solvente empregado foi o clorofórmio, a evaporação do solvente se comparado a outros solventes que normalmente são empregados na preparação de FE do grupo ocorre de forma muito rápida, levando ao recobrimento incompleto de algumas partículas de sílica com o ABC. No entanto observa-se que os diâmetros e formatos das partículas de sílica não se alteram de forma significativa com a presença do ABC e não há aglomeração das partículas, o que é um fator positivo para o enchimento das colunas cromatográficas de forma compacta e homogênea.

4.2 Área superficial específica e estrutura de poros

As características de porosidade e área superficial específica da fase Si(ABC) foram obtidas pelo estudo de isotermas de adsorção de N_2 , conforme proposto pelos métodos BET e BJH (GREGG; SING, 1982). Os resultados obtidos da adsorção estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio na fase Si(ABC).



Fonte: Próprio autor.

De acordo com a isoterma de adsorção de N₂ na fase Si(ABC) apresentada na Figura 6 e, levando em consideração os modelos de isoterma de adsorção, a fase Si(ABC) apresenta um perfil do tipo IV (SING, *et al.*, 1985), o qual é característico de materiais mesoporosos (poros entre 2 e 50 nm de diâmetro) e com histerese do tipo H1, na qual os poros apresentam-se com formatos cilíndricos, regulares e bem definidos. Estas características são provenientes da sílica cromatográfica e indica que após a imobilização do ABC não há mudança na estrutura de poros de forma significativa, o que é adequado para cromatografia.

A partir da adsorção de N₂ na fase Si(ABC) foi possível obter informações quantitativas sobre a área superficial específica e propriedades de poros do material, empregando os métodos BET e BJH, respectivamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades morfológicas da fase Si(ABC) imobilizada termicamente a 150 °C por 16 h.

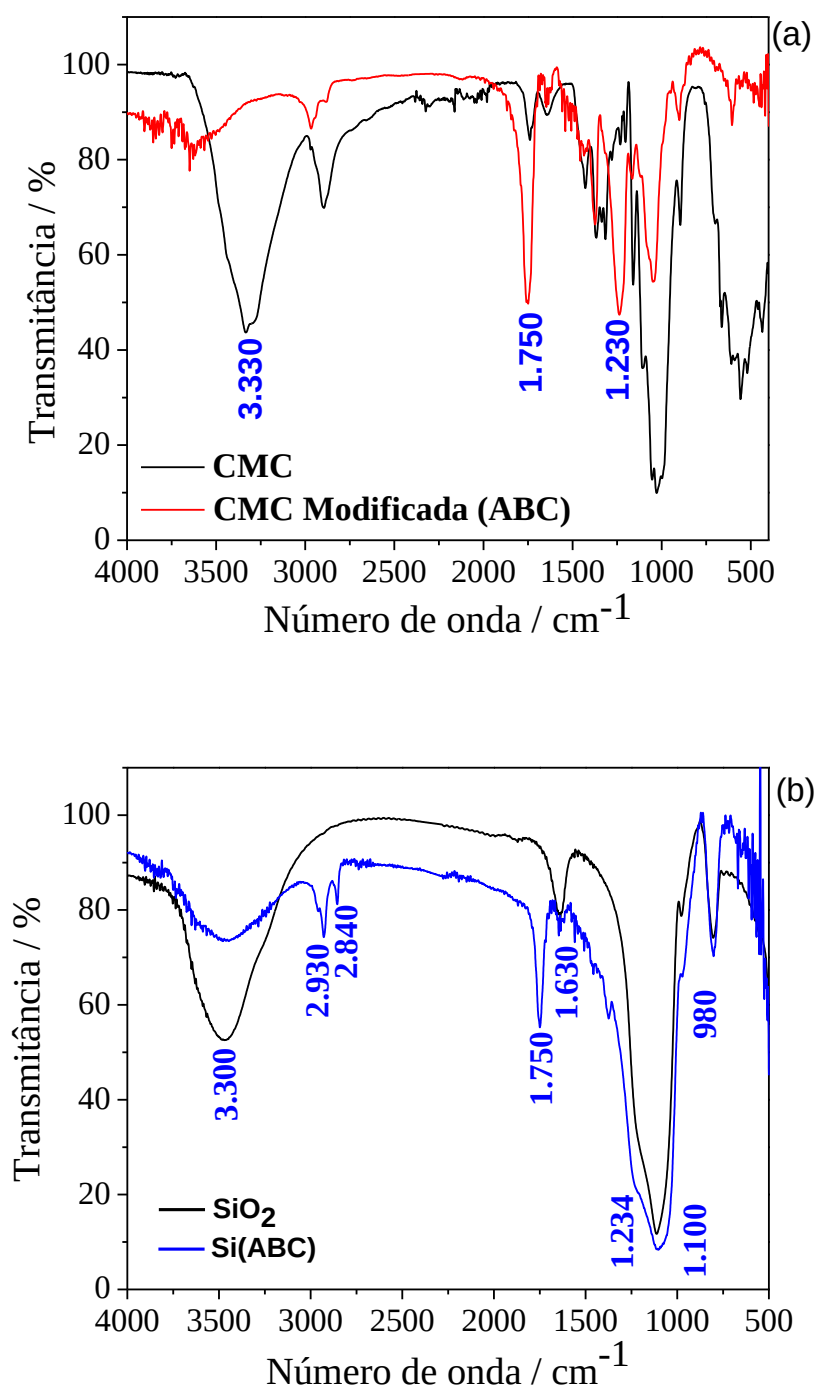
Fase	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	V _p (cm ³ g ⁻¹)	d _p (nm)
SiO ₂	287,3	1,09	20,5
Si(ABC) #4	179,8	0,98	14,1

Observa-se pela Tabela 3 que, comparado ao suporte de sílica antes da modificação com o ABC, a fase Si(ABC) apresentou uma redução de 37 % em sua área superficial específica e que pode ser atribuída à deposição do ABC nos poros da sílica, causando uma redução de 34 % do seu diâmetro e de cerca de 10 % de seu volume. Apesar dessas modificações, a fase Si(ABC) apresentou características morfológicas que ainda atendem aos requisitos necessários (p.14) para ser utilizada na CLAE (MEYER, 2010).

4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR) foi empregada para confirmar a modificação da celulose pelo acetato butirato (ABC) e a modificação da sílica com o ABC, sendo os espectros FT-IR dos materiais apresentados na Figura 7.

Figura 7. Espectros FT-IR de transmitância (a) do polímero da celulose e (b) da fase da sílica com o ABC, Si(ABC)#4.



Fonte: Próprio autor.

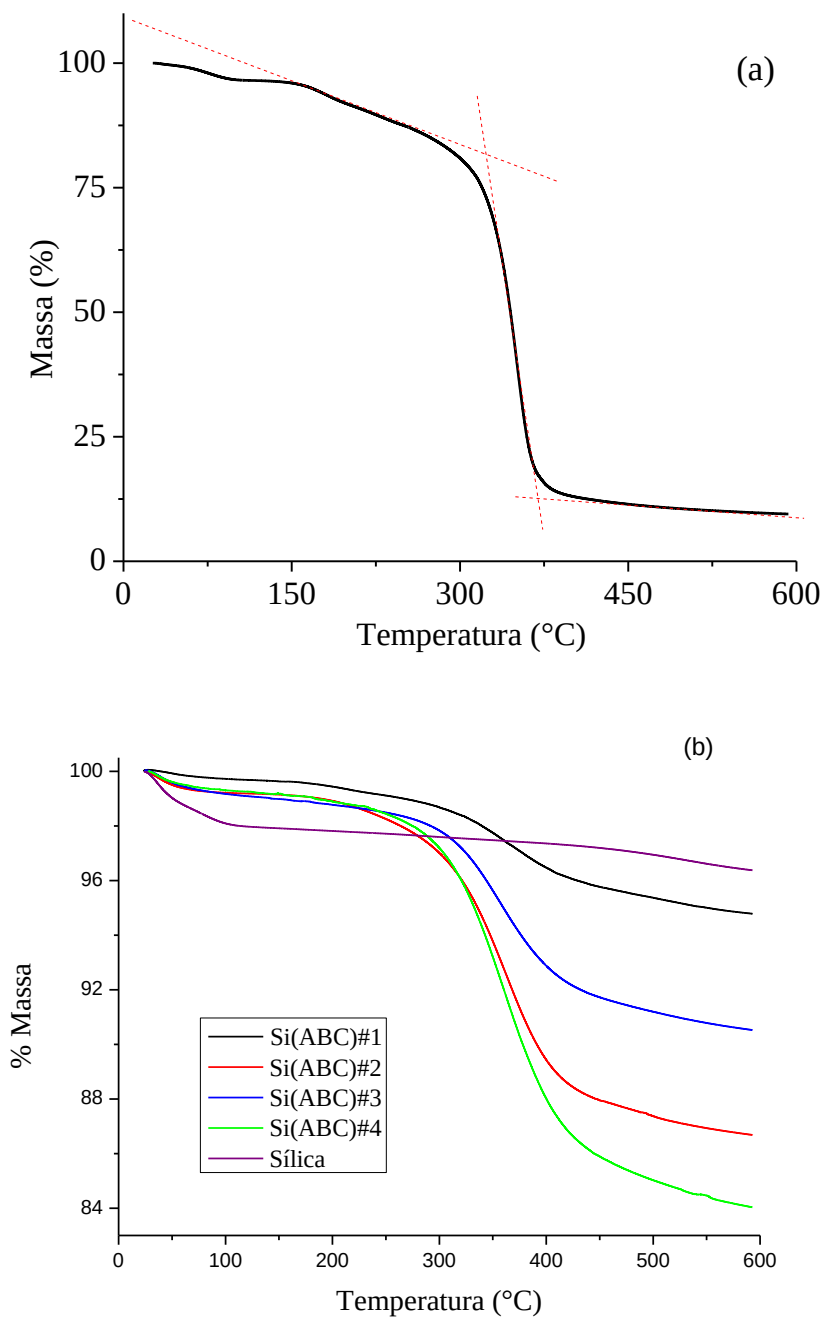
Através dos espectros FT-IR apresentados na Figura 7a foi possível observar a modificação da celulose pelo anidrido acético e anidrido butírico produzindo o acetato butirato de celulose, uma vez que se nota uma redução do estiramento em 3330 cm^{-1} , referente as

vibrações de grupos -OH. Essa redução está associada a ligação de grupos acetato e grupos butirato às OH da celulose, reduzindo o número de grupos -OH no material, bem como reduzindo a quantidade de moléculas de água adsorvidas na celulose. Pode-se observar também uma melhor definição do sinal em torno de 2930 e 2840 cm^{-1} , referente aos estiramentos C-H de grupos CH_2 e CH_3 , possivelmente devido à presença de grupos CH_3 , provenientes do acetato e butirato, no derivado celulósico. Uma outra evidência da modificação da celulose é observada pelo estiramento em 1750 cm^{-1} referente as vibrações de grupos C=O que não estão presentes na celulose, porém presentes em ésteres de celulose, como o derivado celulósico em questão. Na Figura 7b, que apresenta os espectros FT-IR da sílica e da fase Si(ABC), observa-se o aparecimento dos estiramentos em 2850 e 2960 cm^{-1} referentes às vibrações C-H de grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente, provenientes do ABC e o estiramento em 1750 cm^{-1} referente as vibrações do grupo C=O, redução do estiramento em 1680 cm^{-1} referente a diminuição da água adsorvida na sílica e mudança no perfil do estiramento em 980 cm^{-1} , esses estiramentos são evidências que sugerem a imobilização térmica do ABC sobre a sílica.

4.4 Análise termogravimétrica

A fase Si(ABC) foi avaliada quanto à sua estabilidade térmica, uma vez que esta foi preparada por tratamento térmico durante a imobilização e seria importante realizar a imobilização sem a degradação da estrutura polimérica do ABC, escolhendo temperaturas abaixo da sua temperatura de decomposição térmica. As curvas TGA do ABC e da fase Si(ABC) estão apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Curvas TGA para (a) o ABC e para (b) comparação de todas as fases Si(ABC).



Fonte: Próprio autor.

Pela Figura 8a observa-se que o ABC apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 280 °C, perdendo cerca de 15 % de massa que pode estar associada a presença de água adsorvida na celulose nos grupos hidroxilas não modificados e resíduos de solventes da sua síntese. Essa condição habilita o ABC a ser imobilizado termicamente na sílica dentro de uma faixa relativamente ampla de temperaturas. As fases Si(ABC), como visto na

Figura 8b, apresentam estabilidade térmica próxima a do ABC puro e a sílica pura apresenta uma pequena perda de massa no começo da análise que podemos associar a água adsorvida na sua superfície. As perdas de massa das fases Si(ABC) foram calculadas a partir das curvas TG apresentadas na Figura 8, na região entre 250 e 450 °C, referente a decomposição do derivado celulósico. As porcentagens de perda de massa referentes à decomposição do ABC nas fases Si(ABC) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de massa perdida na região entre 250 e 450 °C em cada fase Si(ABC) obtidas por análise termogravimétrica.

Fases Si(ABC)	Temperatura de imobilização (°C)	Tempo de imobilização (h)	% massa perdida
#1	100	8	4,0%
#2	150	8	11,0%
#3	100	16	9,0%
#4	150	16	16,0%

Pode-se atribuir a perda de massa na região de 250 a 450 °C à degradação do ABC, visto que a sílica não se degrada nessa faixa de temperatura. Nota-se que as fases #2 e #4 possuem maior quantidade de ABC. Estas fases foram imobilizadas a temperaturas mais elevadas. Calculando os efeitos que a temperatura e o tempo possuem sobre a imobilização do ABC na sílica, a partir da Equação 3.

$$Ef_x = \bar{R}_+ - \bar{R}_- \quad \text{Equação 3}$$

Em que: E_f é o efeito de uma variável (temperatura ou tempo), R_+ é a média das respostas na maior temperatura ou no maior tempo, R_- é a média das respostas na menor temperatura ou no menor no tempo.

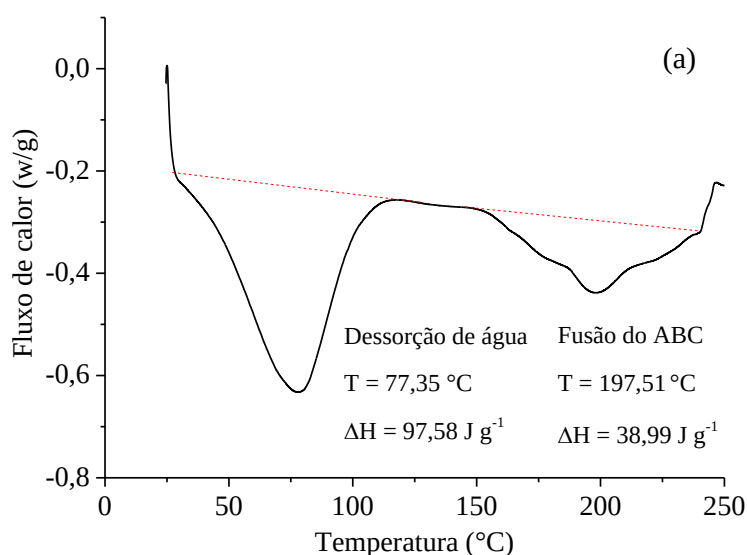
De acordo com a Equação 3, a temperatura possui um efeito de +5,3 % na porcentagem de ABC imobilizado na sílica, enquanto o efeito do tempo foi de +1,1 %. Desta forma, pode-se afirmar que a imobilização do ABC está fortemente ligada à temperatura de imobilização. Quanto mais alta a temperatura de imobilização, maior a quantidade de ABC imobilizada na superfície da sílica.

4.5 Calorimetria diferencial de varredura

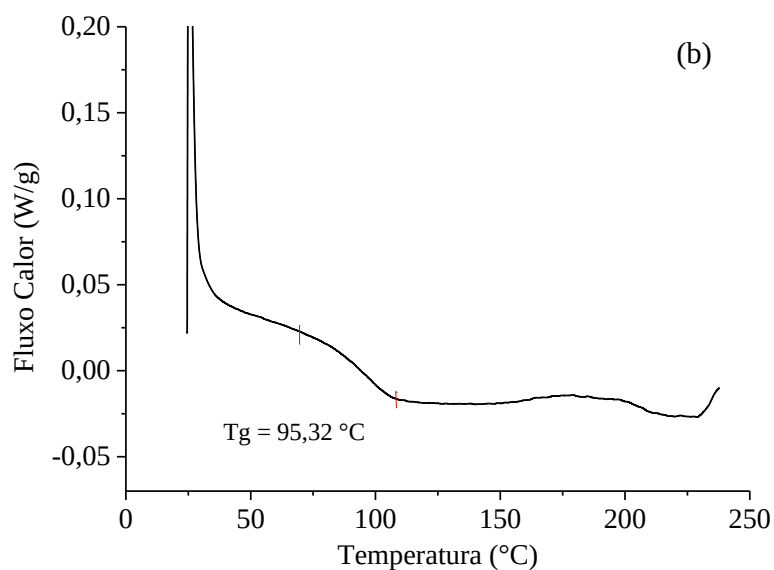
A análise do acetato butirato de celulose por DSC fornece importantes informações como temperatura de fusão em processos endotérmicos, temperatura de cristalização em processos exotérmicos, entalpias relacionadas a estas transformações e temperatura de transição vítrea. Com estas informações é possível obter informações sobre o polímero ABC preparado e sua atuação como material de separação. Na Figura 9 estão apresentadas as curvas de DSC do acetato butirato de celulose.

Através da primeira varredura, Figura 9a, é possível observar que houve a dessorção da água na temperatura de 77,35 °C e que houve a fusão do ABC na temperatura de 197,51 °C. Esse valor é dependente do grau de substituição da celulose e da composição, em termos de acetato e butirato, do ABC, no entanto, está em acordo com a faixa de temperatura de fusão do ABC comercial, que varia de 127 a 240 °C (CHEMICAL BOOK, 2019). Na segunda varredura é possível obter a temperatura de transição vítrea (T_g) em 95,32 °C, portanto, as imobilizações realizadas ocorreram sempre acima da T_g , indicando que as moléculas de ABC apresentaram maior mobilidade das cadeias do polímero para se moverem e interagirem com os grupos ativos da superfície da sílica, garantindo um melhor recobrimento da sílica.

Figura 9. Curvas de (a) primeira e (b) segunda varreduras de DSC para o acetato butirato de celulose.



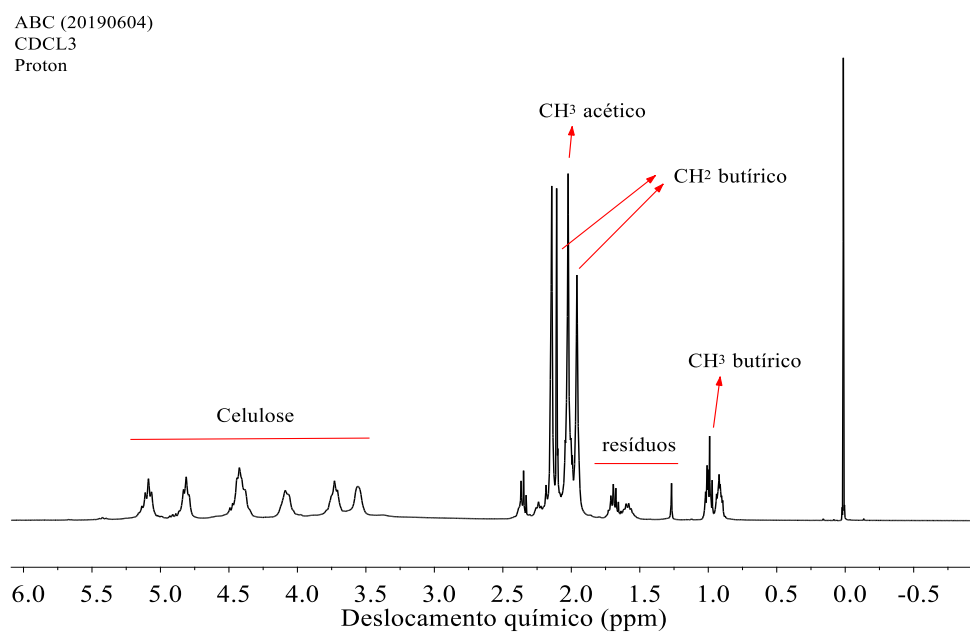
Continuação da Figura 9.



Fonte: Próprio autor.

4.6 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A informação estrutural do produto obtido da síntese do acetato butirato de celulose foi também medida por RMN de ^1H . A Figura 10 apresenta o espectro de RMN de ^1H de uma amostra de acetato butirato de celulose.

Figura 10. RMN de ^1H do acetato butirato de celulose.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com o espectro de RMN de ^1H na Figura 10, os deslocamentos registrados na faixa de δ 5,1 até δ 3,55 são característicos da celulose (HUANG, *et al.*, 2011). Os deslocamentos registrados em δ 2,11 e δ 1,90 são atribuídos aos grupos CH_2 do butirato, enquanto os deslocamentos em δ 2,02 são atribuídos ao grupo CH_3 do acetato e em δ 0,89 atribuído ao grupo CH_3 do butirato. Dessa forma, os deslocamentos registrados no espectro de RMN de ^1H confirmam a modificação da celulose por grupos acetato/butirato, empregado como recobrimento polimérico de fases estacionárias para CLAE-FR.

O grau de substituição (GS) e as porcentagens de acetato e de butirato no ABC foram determinados a partir do espectro de RMN de ^1H da amostra, de acordo com (HUANG, *et al.*, 2011). As Equações 4-8 foram utilizadas para a determinação do GS e das porcentagens dos modificadores na celulose.

$$GS_A = \frac{I_{\text{acetato}} \times 7}{I_{\text{celulose}} \times 3} \quad \text{Equação 4}$$

$$GS_B = \frac{I_{\text{butirato}} \times 7}{I_{\text{celulose}} \times 3} \quad \text{Equação 5}$$

$$GS_{\text{total}} = GS_A + GS_B \quad \text{Equação 6}$$

$$\%A = \frac{GS_A \times 43}{162 - (GS_A + GS_B) + GS_A \times 43 + GS_B \times 71} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$$\%B = \frac{GS_B \times 71}{162 - (GS_A + GS_B) + GS_A \times 43 + GS_B \times 71} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Em que: I_{acetato} é o valor da integral para o sinal do grupo CH_3 do acetato; I_{butirato} é o valor da integral para o sinal do grupo CH_3 do butirato; I_{celulose} é o valor da integral para o sinal da celulose; GS_A é o grau de substituição dos grupos acetato; GS_B é o grau de substituição dos grupos butirato; GS_{total} é o grau de substituição total do ABC (escala de 0 a 3); %A é a porcentagem de grupos acetato em uma unidade de anidroglicose; %B é a porcentagem de grupos butirato em uma unidade de anidroglicose.

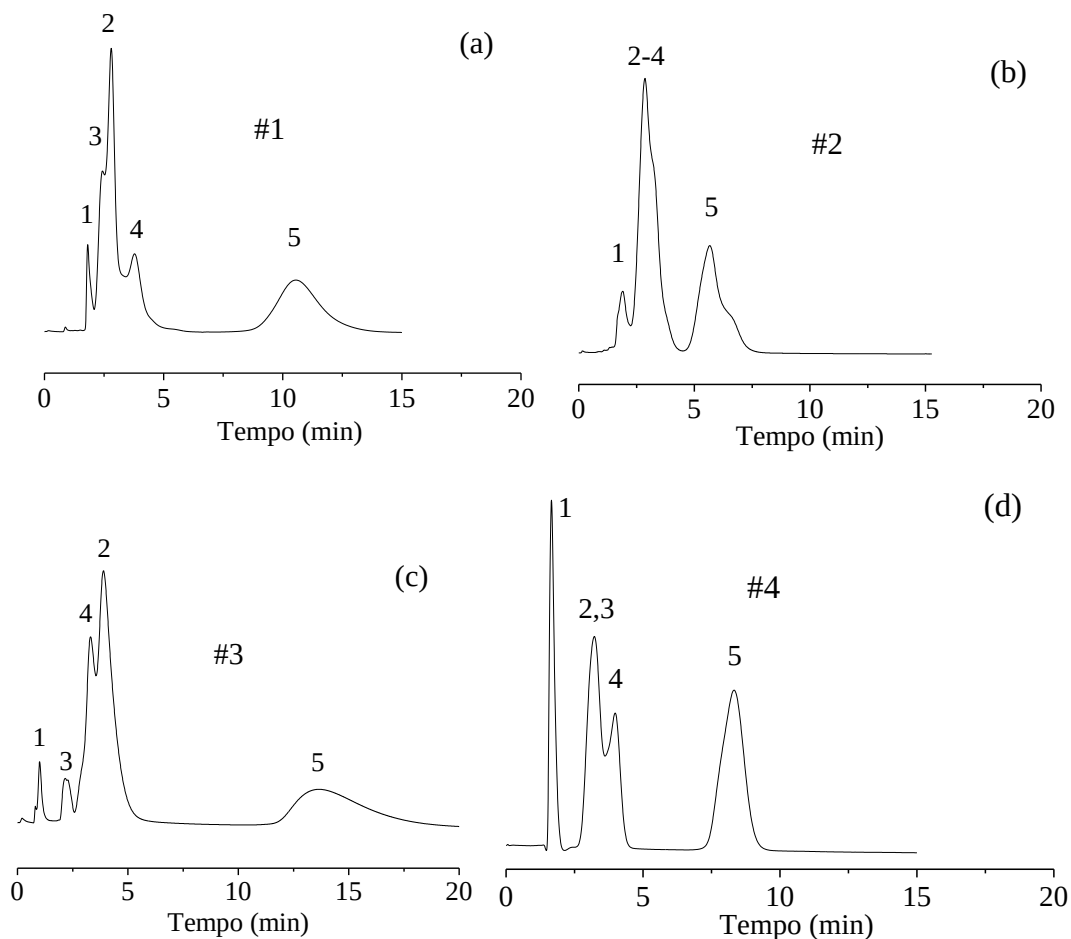
Considerando os resultados de RMN de ^1H e as Equações 4-8, obteve-se um grau de substituição total $GS_{\text{total}} = 0,65$ ($GS_A = 0,38$ e $GS_B = 0,27$), que corresponde a ~22 % de modificação dos grupos OH de uma unidade de anidroglicose. O ABC, produzido neste trabalho e imobilizado sobre a sílica, apresenta 8,4 % de unidades de grupos acetato e 13,8 % de unidades de grupos butirato modificados em uma unidade de anidroglicose.

4.7 Avaliação cromatográfica das fases Si(ABC)

4.7.1 Separação da mistura teste hidrofóbica

A análise da separação de uma mistura teste padrão contendo compostos hidrofóbicos foi realizada pelas fases Si(ABC) preparadas neste trabalho. Essa mistura é normalmente empregada para a caracterização do modo de separação das fases estacionárias, a partir da ordem de eluição dos compostos, sendo constituída de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Assim, observou-se que a fases estacionárias atuam tipicamente na modalidade de fase reversa, uma vez que a ordem de eluição da mistura ocorreu do composto menos hidrofóbico para o mais hidrofóbico da mistura. A composição ideal da fase móvel para a análise da mistura na fase Si(ABC) foi determinada a partir da separação da mistura teste padrão, sendo avaliadas diferentes condições de fase móvel MeOH:H₂O. Todas as fases Si(ABC) foram avaliadas inicialmente por uma fase móvel MeOH:H₂O com composição 50:50, v/v e ajustadas até a obtenção da melhor separação da mistura a partir da mudança de composição. Desta forma, a melhor condição de separação obtida para a fase Si(ABC) #1 foi com MeOH:H₂O 20:80, v/v; para a fase Si(ABC) #2 foi MeOH:H₂O 40:60,v/v; para a fase Si(ABC) #3 foi MeOH:H₂O 20:80,v/v, e; para a fase Si(ABC) #4 foi MeOH:H₂O 30:70,v/v, os cromatogramas destas separações estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica pelas fases (a) Si(ABC) #1, fase móvel MeOH:H₂O (20:80, v/v), (b) Si(ABC) #2, fase móvel MeOH:H₂O (40:60 v/v), (c) Si(ABC) #3, fase móvel MeOH:H₂O (20:80, v/v), (d) Si(ABC) #4, fase móvel MeOH:H₂O (30:70, v/v). Para todas as fases foram empregadas vazão 0,4 mL min⁻¹, detecção UV a 254 nm, temperatura de 25 °C. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno.



Fonte: Próprio autor.

É possível observar nos cromatogramas da Figura 11 que não houve a completa separação de todos os compostos presentes na mistura hidrofóbica. A uracila que é empregada na mistura padrão e nas demais misturas avaliadas nesse trabalho é utilizada como marcador do tempo da fase móvel, tempo que a fase móvel leva para percorrer todo o sistema cromatográfico desde o momento da injeção até a detecção. Os compostos benzeno e benzonitrila não são separados adequadamente, em fases reversas típicas. A co-eluição desses compostos está associada a contribuição hidrofílica da celulose, que proporciona um aumento da retenção da benzonitrila na fase Si(ABC) e uma diminuição da retenção do benzeno, levando a sobreposição dos seus picos e, na maioria dos casos, na inversão da ordem de eluição. A mistura hidrofóbica não é adequadamente separada pela fase Si(ABC) provavelmente devido a baixa

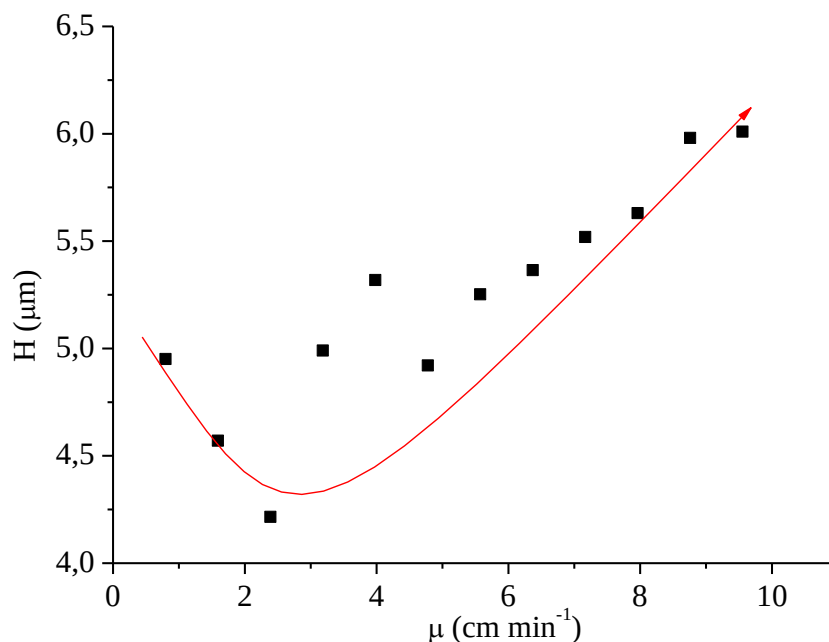
hidrofobicidade da camada polimérica, resultando em baixa retenção dos compostos. De toda a forma, a fase Si(ABC) #4 foi a que melhor resolveu a mistura, possivelmente devido a maior quantidade de ABC imobilizada como visto nos resultados de TG.

Um dos principais problemas relacionados a CLAE é a geração de grandes volumes de resíduo orgânico. Isto é devido ao alto consumo de solvente orgânico na fase móvel, principalmente na modalidade de fase reversa. Nota-se que a separação da mistura teste padrão foi alcançada com um alto teor de água na composição da fase móvel, minimizando o consumo e geração de resíduos orgânicos nas análises. Esta mesma mistura separada em outras fases estacionárias reversas preparadas dentro do grupo, necessitou de fases móveis contendo entre 50-70% de solvente orgânico (DIB, 2013) (SOUZA, 2016), mesmo empregando fases estacionárias com hidrofobicidade menor que fases comerciais típicas. Logo, além de proporcionar maior retenção para compostos polares, medida pela retenção da benzonitrila, a fase Si(ABC) tem como vantagem a elevada porcentagem de água na fase móvel para que haja uma melhor separação dos compostos.

4.7.2 Curva de van Deemter

A vazão ótima de fase móvel na fase estacionária Si(ABC) foi definida com base na curva de van Deemter, que relaciona a altura de um prato (H) à velocidade linear da fase móvel (μ), empregando MeOH:H₂O (30:70, v/v). A vazão ótima determina a velocidade linear da fase móvel que proporciona a máxima eficiência de coluna (menor valor da altura de um prato, H), localizada no ponto mínimo da curva. Os termos H e μ foram obtidos a partir do valor de eficiência para o pico do naftaleno, do comprimento da coluna (L) e do tempo de retenção da uracila. A curva de van Deemter para a fase Si(ABC) #4 obtida está apresentada na Figura 12.

Figura 12. Curva de Van Deemter para a fase Si(ABC)#4 imobilizada termicamente.



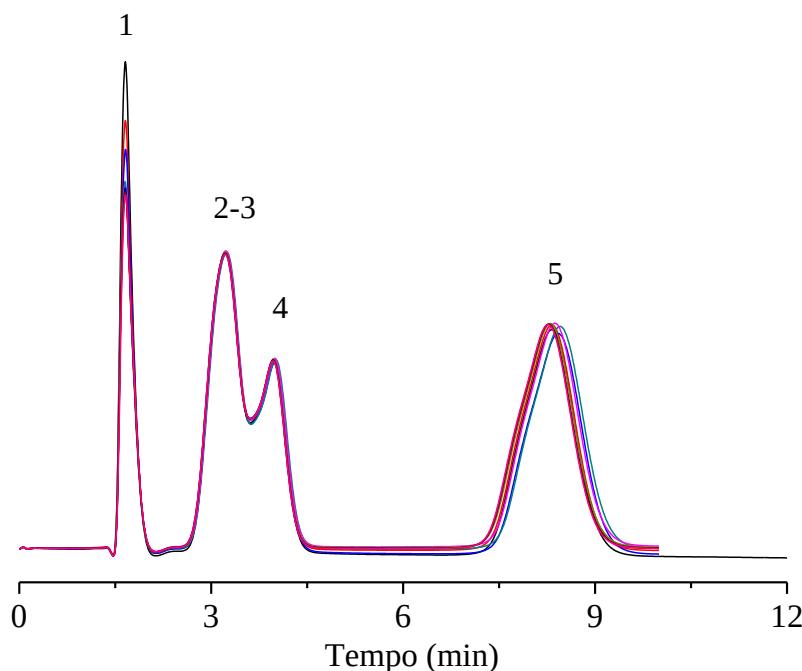
Fonte: Próprio autor.

Através da curva de Van Deemter foi possível observar que a máxima eficiência da fase estacionária foi obtida em velocidade linear da fase móvel de 2,5 cm min⁻¹, o que corresponde a uma vazão de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹.

4.7.3 Estudo da repetibilidade do tempo de retenção na fase Si(ABC)

Para avaliar a fixação da camada de ABC sobre a sílica, a fase Si(ABC) foi submetida a análise contínua da mistura teste hidrofóbica para monitoramento do tempo de retenção e da área dos picos dos compostos. Como a fase móvel passará continuamente pela fase estacionária, uma boa fixação do ABC sobre a sílica é garantida pela manutenção constante desses parâmetros. Os cromatogramas obtidos de 9 análises foram sobrepostos e estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica após 9 análises sequenciais na fase Si(ABC)#4. Condições de análise: Fase móvel MeOH:H₂O (30:70, v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: 1- uracila, 2- benzonitrila, 3- benzeno, 4- tolueno e 5- naftaleno.



Fonte: Próprio autor.

Pelos cromatogramas obtidos da separação da mistura teste hidrofóbica a partir de sucessivas análises na fase Si(ABC)#4, observa-se que os tempos de retenção dos compostos não apresentaram variação significativa, o que indica a efetividade da imobilização do ABC sobre a sílica, ou seja, não há lixiviação do ABC com a passagem da fase móvel.

4.7.4 Protocolo de Tanaka e colaboradores

O protocolo de caracterização cromatográfica desenvolvido por Tanaka e colaboradores (KIMATA, *et al.*, 1989) é aplicado para avaliar a qualidade e as propriedades das fases estacionárias para a modalidade de fase reversa, este método é utilizado por diversos grupos de pesquisas e fabricantes no desenvolvimento de novas fases estacionárias. Esse protocolo é constituído por quatro misturas teste que empregam condições pré-definidas de análise. Através do fator de retenção, calculado pela Equação 9.

$$k = \frac{t_{\text{analito}} - t_m}{t_m}$$

Equação 9

O t_m se refere ao primeiro pico no cromatograma referente a um composto que foi eluído pela fase móvel, porém sem interagir com a fase estacionária, dessa forma, esse composto gasta o mesmo tempo que a fase móvel para percorrer o sistema cromatográfico, desde a injeção da amostra até a detecção no sistema de detecção. Esse tempo, definido como t_m é o tempo da fase móvel. Sendo assim é possível avaliar os parâmetros definidos pelo protocolo, sendo eles:

- **Hidrofobicidade (k_{PB})** – É medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno presente na mistura I. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento da superfície do suporte cromatográfico;
- **Seletividade hidrofóbica (α_{CH_2})** – É medida pela razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB}/k_{BB}$. Esta é uma medida da capacidade da fase em diferenciar pequenos grupos, a seletividade hidrofóbica mede o grau de separação de alquilbenzenos distintos por um grupo CH_2 ;
- **Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$)** – É medida pela razão dos fatores de retenção do trifenileno e da o-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$. O $\alpha_{T/O}$ mede a capacidade da fase estacionária em separar duas substâncias com polaridade similares, no entanto com diferença em sua geometria e disposição espacial;
- **Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$)** – Esta propriedade é obtida pela razão dos fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C/k_P$, presentes na mistura II. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupo silanóis disponíveis na fase estacionária que estão aptos a formarem ligações de hidrogênio com componentes de amostra;
- **Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$)** – Propriedade medida pela razão dos fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60} = k_B/k_P$, presentes na mistura III, empregando a fase móvel tamponada em pH 7,60. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanfílica total da fase estacionária;
- **Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$)** – Propriedade medida pela razão dos fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$, presentes na mistura IV, empregando fase móvel tamponada em pH 2,70. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária.

Os resultados obtidos a partir dos parâmetros para as fases estacionárias Si(ABC) estão apresentados na Tabela 5.

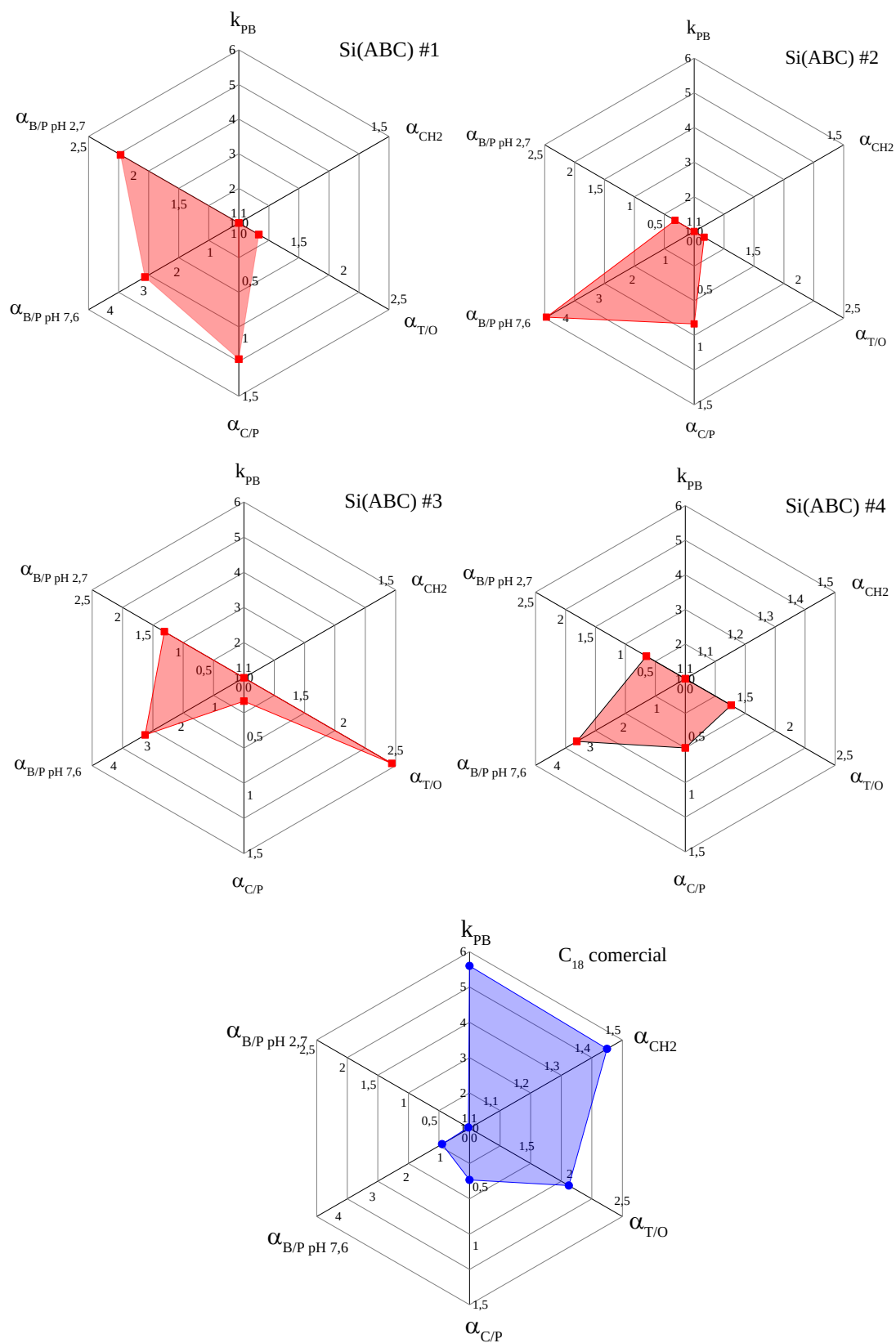
Tabela 5. Propriedades de retenção cromatográfica obtidas com a separação das misturas de Tanaka pelas fases Si(ABC).

Parâmetros	k _{PB}	α_{CH2}	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{C/P}$	$\alpha_{B/P}$ pH 7,6	$\alpha_{B/P}$ pH 2,7
Si(ABC) #1	1,00	1,00	1,20	1,18	2,81	2,18
Si(ABC) #2	1,00	1,00	0,41	0,80	4,45	0,32
Si(ABC) #3	1,00	1,00	2,56	0,20	2,93	1,31
Si(ABC) #4	1,00	1,00	1,46	0,60	3,26	0,65
C ₁₈ comercial	5,60	1,45	2,04	0,44	0,81	0,02

A partir dos valores apresentados na Tabela 5, é difícil fazer uma análise global das propriedades de retenção das fases Si(ABC) devido a alternância de valores de uma dada propriedade para outra. Para facilitar a visualização dessas propriedades e realizar uma análise comparativa, os valores da Tabela 5 foram plotados em gráficos do tipo radar e comparados com os resultados obtidos para valores típicos de fases estacionárias C₁₈ comerciais, também apresentados na forma de gráfico radar na Figura 14. Os valores dos parâmetros de Tanaka da fase C₁₈ quimicamente ligada foram obtidos da média de 10 colunas comerciais (CRUZ, *et al.*, 1997).

De uma forma geral, nota-se que as fases Si(ABC) na Figura 14 possuem uma menor hidrofobicidade e menor seletividade hidrofóbica que a fase comercial de C₁₈ quimicamente ligada, como era de se esperar pelo tamanho das cadeias laterais acetato e butirato em cada material. Porém, as fases Si(ABC) apresentam maior seletividade para compostos polares, medida pelos parâmetros $\alpha_{C/P}$ e $\alpha_{B/P}$. A maior hidrofobicidade ou maior hidrofiliidade das fases é medida pelo tamanho da área hachurada à direita ou à esquerda, respectivamente, no gráfico radar. Desta forma, observa-se que as fases Si(ABC) apresentam maior área hachurada do lado esquerdo, enquanto a fase comercial maior área do lado direito, confirmando a característica de maior polaridade da fase preparada no laboratório. Espera-se, portanto, uma interação mais efetiva com compostos polares. A fase Si(ABC) #3 apresenta um maior valor de seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$), o que provavelmente se deve à contribuição da quiralidade da celulose, isso indica um alto potencial para separação de compostos isoméricos, no entanto, as fases #1 e #4 apresentaram características de retenção melhores para separação, desde a mistura hidrofóbica até as misturas de Tanaka.

Figura 14. Gráficos radar das propriedades de retenção das fases estacionárias Si(ABC) e de uma fase C_{18} comercial.

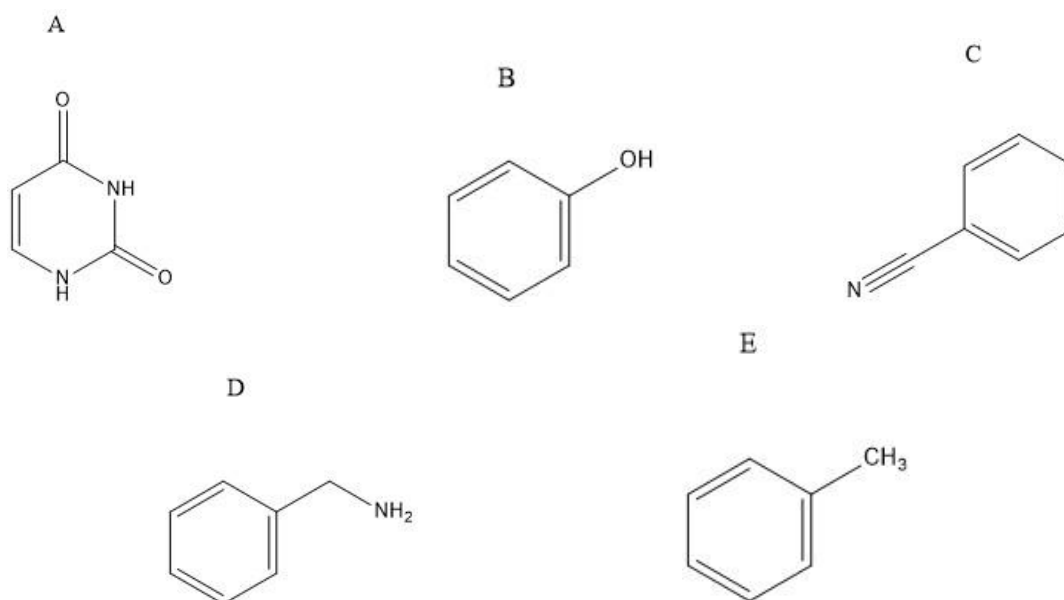


Fonte: próprio autor.

4.8 Separação de uma mistura de compostos polares

Uma mistura constituída por compostos mais polares, a partir do resultado do protocolo de Tanaka, foi empregada para avaliar a capacidade de separação pela fase Si(ABC) #4. A mistura foi composta por uracila, fenol, benzonitrila, benzilamina e tolueno. O tolueno foi empregado na mistura como composto hidrofóbico para avaliar a ordem de eluição da mistura e confirmar o modo de separação por fase reversa. As estruturas dos compostos avaliados na mistura são apresentadas na Figura 15.

Figura 15. Estruturas moleculares dos compostos: (A) uracila, (B) fenol, (C) benzonitrila, (D) benzilamina e (E) tolueno.



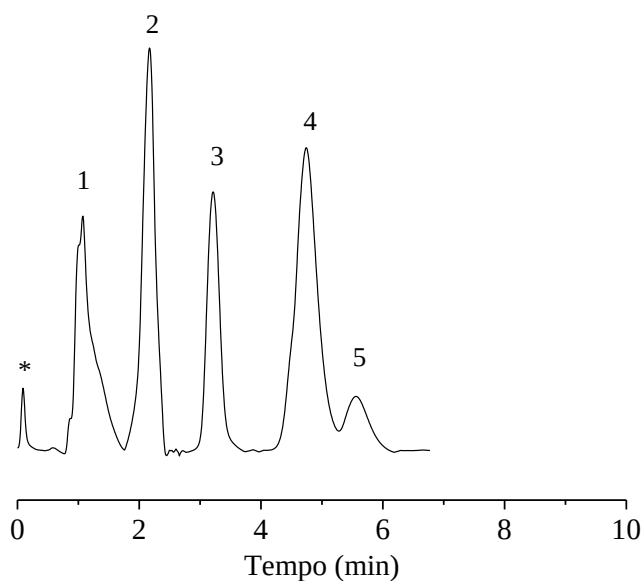
Fonte: próprio autor.

Através da Figura 15 observa-se que os compostos possuem grupamentos polares, exceto o tolueno, sendo assim espera-se uma baixa retenção em fases estacionárias apolares, características de fase reversa, como por exemplos coluna C₁₈ e C₈ comercial e, portanto, apresentando dificuldade de separação. Dada a capacidade da fase Si(ABC) de separar compostos polares a mistura foi então avaliada cromatograficamente, e o melhor perfil de separação foi obtida na composição MeOH:H₂O (10:90, v/v), com detecção em 254 nm. O cromatograma está apresentado na Figura 16.

Através do cromatograma apresentado na Figura 16 é possível observar que houve a total separação dos compostos polares, sendo a eluição do composto mais polar para o menos

polar. Além disso, observa-se que essa separação ocorreu em um tempo relativamente curto de aproximadamente 6 minutos. Pensada para modalidade de fase reversa a fase Si(ABC) responde bem na separação de composto polares, empregando alta porcentagem de água na composição da fase móvel, gerando menor quantidade de resíduo orgânico na análise.

*Figura 16. Cromatograma da separação da mistura de compostos polares pela fase Si(ABC) #4. Condições: fase móvel MeOH:H₂O (10:90, v/v); 1,0 mL min⁻¹; detecção UV 254nm. Coluna: 150 mm × 4,0 mm d.i. Identificação dos compostos: *impureza, 1- uracila, 2- fenol, 3- benzonitrila, 4- benzilamina e 5- tolueno.*

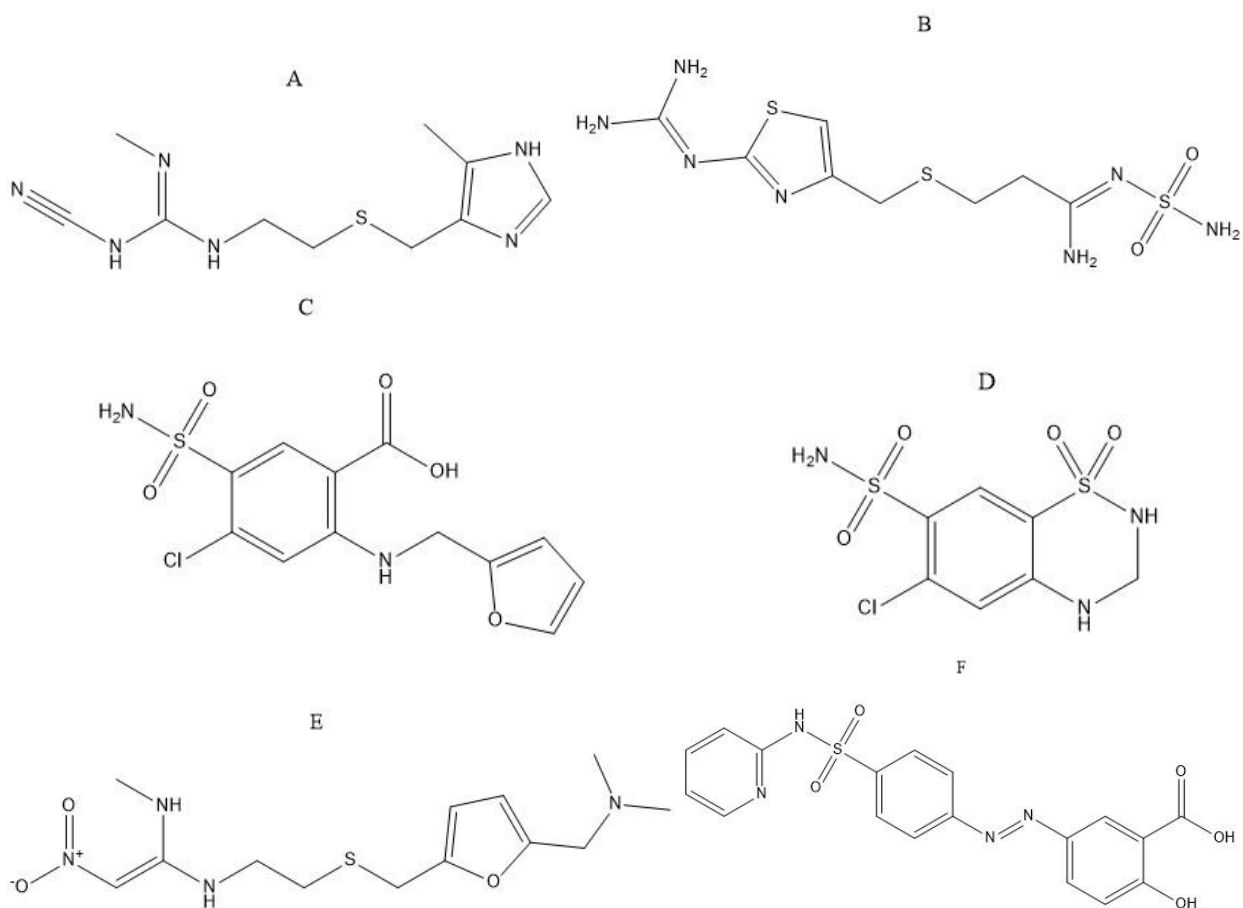


Fonte: próprio autor.

4.9 Separação de mistura de fármacos

Uma mistura de fármacos composta por cimetidina (pKa 13,4), famotidina (pKa 9,3), ranitidina (pKa 7,8), furosemida (pKa 9,8), hidroclorotiazida (pKa > 9,1) e sulfasalazina (pKa 8,0) foi empregada para avaliar a potencialidade da fase Si(ABC) na separação de compostos básicos. As estruturas dos fármacos avaliados neste trabalho estão apresentadas na Figura 17.

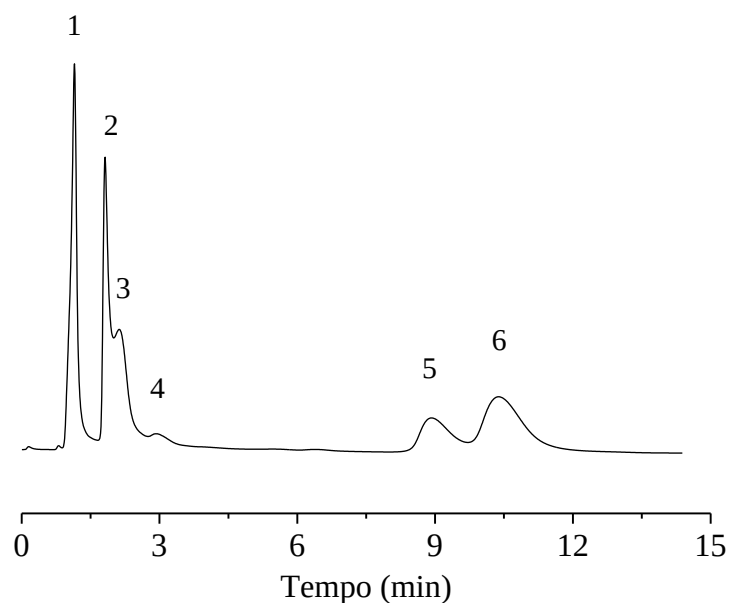
Figura 17. Estruturas moleculares dos fármacos: (a) cimetidina, (b) famotidina, (c) furosemda, (d) hidroclorotiazida, (e) ranitidina e (f) e sulfasalazina.



Fonte: Próprio autor.

Através da Figura 17 observa-se que todos os compostos possuem características básicas com valores de pKa maiores que 7, sendo assim apresentam baixa retenção em fases estacionárias apolares, características de fases reversas e, portanto, apresentando dificuldade de separação. Dada a capacidade da fase Si(ABC) de separar compostos polares a mistura foi então submetida à separação pela fase Si(ABC)#4, sendo o melhor resultado alcançado com a composição MeOH:H₂O (30:70, v/v), com detecção em 220 nm. O cromatograma da separação dos fármacos está apresentado na Figura 18.

Figura 18. Cromatograma da separação da mistura de fármacos obtida na fase Si(ABC) #4. Condições: MeOH:H₂O (30:70, v/v); 0,4 mL min⁻¹; detecção UV 220nm. Identificação dos compostos: 1- furosemida, 2- hidroclorotiazida, 3- ranitidina, 4- sulfasalazina, 5- famotidina e 6- cimetidina.



Fonte: Próprio autor.

Através do cromatograma apresentando na Figura 18 foi possível observar que houve uma separação relativamente boa da mistura de fármacos, haja vista a complexidade de separação dessa mistura em fases comerciais típicas. O tempo de análise foi relativamente curto, cerca de 12 min, empregando fase móvel com alto teor de água em sua composição, 70 %. Desta forma, observa-se que as fases Si(ABC) apresentam características de fase reversa, porém com seletividade diferenciada para compostos polares, requerendo maior porcentagem de água, aproximando a CLAE-FR de uma técnica de separação mais limpa.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que há potencialidade no uso de derivados celulósicos, como o acetato butirato de celulose, na preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência.

As características morfológicas, estrutural e de retenção das partículas de Si(ABC) se apresentam adequadas para finalidades cromatográficas e, em particular, para a separação de substâncias com características mais hidrofílicas no modo de fase reversa. A melhor preparação da fase Si(ABC) se deu na temperatura de 150°C e tempo de imobilização de 16 horas. Onde as separações de compostos polares e fármacos neste trabalho pela fase Si(ABC)#4, indicaram que a fase Si(ABC) interage mais fortemente com compostos polares requerendo maior porcentagem de água na fase móvel para a eluição dos compostos da coluna cromatográfica. Essa condição é altamente vantajosa para a separações cromatográficas, uma vez que reduz o teor orgânico da fase móvel, gerando menor quantidade de resíduos orgânicos. Em conclusão, a preparação de fases estacionárias baseadas na imobilização de acetato butirato de celulose sobre sílica é viável e resulta em materiais de separação com características intrínsecas de retenção provavelmente devido à contribuição da celulose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. R. S. **Síntese e caracterização do acetato butirato de celulose.**

Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutana, MG, p. 36-47. 2015.

BIEN-VOLGELSANG, U. et al. Syntheses of stationary phases for reversed-phase LC using silanization and polymer coating. **Chromatographia**, 19, n. 1, 1984. 170-179.

BOTTOLI, C. B. G. et al. Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 948, 2002. 121-128.

CARVALHO, G. O. **Desenvolvimento de Fases Estacionárias Baseadas em Poli(Óxido de Etileno-co-Dimetilsiloxano) Imobilizado Termicamente Sobre Sílica para Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica.** Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, p. 98. 2017.

CARVALHO, G. O.; SILVA, C. G. A.; FARIA, A. M. A new stationary phase for analysis of hydrophobic compounds by RP-LC. **Chromatographia**, 79, n. 2, 2016. 19-27.

CHEMICAL BOOK. Chemical Book. **Chemical Book**, 2019. Disponível em:

<https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB4484697.aspx>. Acesso em: 30 junho 2019.

COLLINS, C. H. Michael Tswett e o "nascimento" da cromatografia. **Scientia Chromatographica**, 1, 2009. 7-20.

CRUZ, E. et al. Chromatographic classification of commercially available reverse-phase HPLC columns. **Chromatographia**, 44, n. 3/4, 1997. 151-161.

DIB, S. R. **Desenvolvimento de uma fase estacionária baseada na imobilização térmica de poli(etilenimina) sobre sílica, capeada com grupos C18 para CLAE-FR.** Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG, p. 50. 2013.

DIB, S. R.; FARIA, A. M. Polyethyleneimine immobilized on silica endcapped with octadecyl groups as a stationary phase for RP-LC. **Chromatographia**, 77, n. 7-8, 2014. 533-541.

DONINI, I. A. N. et al. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. **Eclética Química Journal**, 35, n. 4, 2010. 165-178.

FARIA, A. M. **Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, p. 216. 2006.

FARIA, A. M.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica. **Journal of Chromatography A**, 1156, 2007. 51-59.

GONÇALVES, C. V. **Separação do racemato N-Boc-Rolipram pelo processo cromatografico de leito movel simulado utilizando fase estacionaria quiral tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em silica**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, p. 120. 2005.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, surface area and porosity**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1982.

HESSE, G.; HAGEL, R. A complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate. **Chromatographia**, 6, n. 6, 1973. 277-280.

HUANG, K. et al. Homogeneous preparation of cellulose acetate propionate (CAP) and cellulose acetate butyrate (CAB) from sugarcane bagasse cellulose in ionic liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 2011. 5376-5381.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. **Microchemical Journal**, 77, 2004. 191-198.

KIMATA, K. et al. Chromatographic characterization of silica-C18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. **Journal of Chromatographic Science**, 27, n. 12, 1989. 721-728.

LOPES, N. P.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1030, 2004. 225-229.

LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, 33, n. 10, 2010. 2155-2164.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, 33, 2010. 1559-1568.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5th. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. 426 p.

NAHUM, A.; HORVARTH, C. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases : I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography**, 203, 1981. 53-63.

NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, 5, n. 2, 2013. 111-135.

PACHECO, S. et al. História da cromatografia líquida. **Revista Virtual da Química**, 7, n. 4, 2015. 1225-1271.

SILVA, C. R. et al. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, 27, n. 2, 2004. 270-276.

SING, K. S. W. et al. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure and Applied Chemistry**, 57, 1985. 603-619.

SOUZA, L. L. **Desenvolvimento de fase estacionária de baixa retenção hidrofóbica e maior estabilidade química à base de sílica aluminizada para CLAE-FR.** Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG. 2016.

TONHI, E. et al. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: I. Physical and chemical characterizations. **Journal of Chromatography A**, 948, 2002. 97-107.

VIEIRA, A. T. **Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas na imobilização térmica do dodecanoato de celulose sobre sílica para CLAE-FR e suas aplicações em análises de compostos polares e enantioméricos.** Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, p. 78. 2018.

VIGNA, C. R. M. **Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, p. 104. 2004.

WEN, X. et al. Preparation and characterization of cellulose laurate ester by catalyzed transesterification. **Carbohydrate Polymers**, 168, 2017. 247-254.

YOHIO, O. et al. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel. **Chemistry Letters**, 13, n. 5, 1984. 739-742.

ZHURAVLEV, L. T. The surface chemistry of amorphous silica. **Colloids and Surfaces A**, 173, 2000. 1-38.