



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



**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.**

Dissertação de Mestrado

Candidata: **Andressa Tironi Vieira**

Orientador: **Prof. Dr. Anízio Marcio de Faria**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção**

ITUIUTABA
AGOSTO DE 2018

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.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, atendendo ao requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Biocombustíveis.

Candidata: **Andressa Tironi Vieira**

Orientador: **Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção**

**ITUIUTABA
AGOSTO DE 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- V65d
2018
- Vieira, Andressa Tironi, 1980-
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 [recurso eletrônico] / Andressa Tironi Vieira. - 2018.
- Orientador: Anizio Marcio de Faria.
Coorientador: Rosana Maria Nascimento de Assunção.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1187>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Biocombustíveis. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Celulose. I. Faria, Anizio Marcio de (Orient.). II. Assunção, Rosana Maria Nascimento de (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. IV. Título.

CDU: 662.756

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 020/PPBIC.

DATA: 06/08/2018

DISCENTE: Andressa Tironi Vieira

MATRÍCULA: 11612PGB005

TÍTULO DO TRABALHO: "Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas na imobilização térmica do dodecaneato de celulose sobre sílica para CLAE-FR".

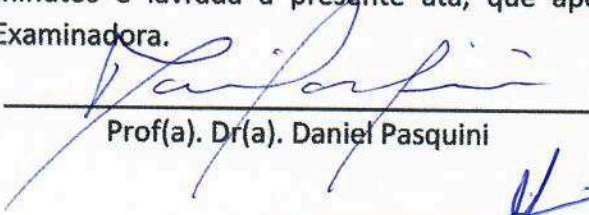
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

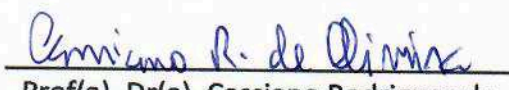
LINHA DE PESQUISA: Produtos e Coprodutos

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO:

Às quatorze horas do dia seis de agosto do ano de dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Daniel Pasquini, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, e Cassiano Rodrigues de Oliveira, do(a) Universidade Federal de Viçosa, e Anízio Marcio de Faria, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS BASEADAS NA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DO DODECANEATO DE CELULOSE SOBRE SÍLICA PARA CLAE-FR E SUAS APLICAÇÕES EM ANÁLISES DE COMPOSTOS POLARES E ENANTIOMÉRICOS.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini


Prof(a). Dr(a). Cassiano Rodrigues de Oliveira


Prof(a). Dr(a). Anízio Marcio de Faria

“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo amor e dedicação incondicionais, por tudo que fizeram e fazem por mim. Devo tudo a eles.

Ao meu companheiro Antônio Carlos (Flash), por todo carinho, apoio e cumplicidade em todas as etapas. Te amo. Obrigada por tudo.

Ao orientador Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria pelos ensinamentos, pela amizade e pela sabedoria com que conduz os trabalhos do grupo CROMAT.

A todos os professores que tive ao longo da vida, foram fundamentais cada um a sua maneira.

A todos amigos do grupo de pesquisa CROMAT, Carlão, Veronica, Marcelo, Andreia, Leonardo, Isabela, Katia e Laís, em especial ao Allyson e a Giselle, por toda ajuda e por estarem sempre dispostos a auxiliar os amigos.

A Prof. Dra. Rosana Maria N. de Assunção, pela atenção, carinho e inúmeras contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Lauro, Diele, Marcos, Mayara, Ana Clara e Prof. Renata, pelos bons e alegres momentos de convivência no bloco A2.

Aos amigos Mateus e Rebecca, pela ajuda e pela amizade.

Aos professores e técnicos da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal por toda colaboração.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pela estrutura predial do laboratório (Chamada Pública MCT/Finep/CT-INFRA - campi Regionais 01/2010) e de parte da instrumentação científica utilizados no desenvolvimento deste projeto (Chamada Pública MCTI/Finep/CT-INFRA 01/2013).

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

RESUMO

A separação de algumas misturas de compostos, como compostos altamente polares, ainda são um desafio para a cromatografia líquida. A necessidade de materiais de separação seletivos para esses compostos tem motivado a busca pela ampliação do campo de aplicação da técnica. Neste trabalho objetivou-se desenvolver uma fase estacionária baseada em um derivado celulósico, o dodecanoato de celulose (DoDC), imobilizado sobre partículas de sílica para atuar na separação rápida e eficiente de substâncias que apresentam dificuldade de análise nas fases comerciais. O polímero foi sintetizado e empregado como recobrimento polimérico das fases estacionárias, Si(DoDC). As fases foram caracterizadas físico-química e cromatograficamente. Os resultados de caracterização físico-química indicaram que o DoDC foi sintetizado, com um grau de substituição na celulose de 1,7, e imobilizado eficientemente na superfície da sílica. Através de um planejamento fatorial foi possível encontrar a melhor condição de preparo das fases Si(DoDC) quanto à carga polimérica, temperatura e tempo de imobilização. 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 DoDC 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(DoDC) atua no modo fase reversa separando eficientemente substâncias por mecanismos de interações hidrofóbicas devido ao grupamento com 12 carbonos do dodecanoato. A fase Si(DoDC) apresentou seletividade estérica intrínseca, que pode ser atribuída à quiralidade da celulose. A aplicação bem sucedida da fase Si(DoDC) na separação de fármacos altamente polares, de isomeria espacial (enantiômeros) e isômeros de posição com cadeias alquiladas lineares, variando de C10 a C13, do agente tensoativo aniônico sulfonato de alquilbenzenos lineares (LAS) mostrou a eficácia desse material como fase estacionária para cromatografia líquida de alta eficiência. Em conclusão, o uso da celulose modificada como revestimento de fase estacionária para cromatografia líquida foi bem sucedido e apresenta uma gama de possibilidades de aplicação na pesquisa e na indústria química.

Palavras-chave: CLAE-FR, dodecanoato de celulose, imobilização térmica, fases estacionárias.

ABSTRACT

The separation of some mixtures of compounds, such as highly polar compounds, are still a challenge for liquid chromatography. The need for selective separation materials for these compounds has been the search for extension of technique application field. The goal of this work was to develop a HPLC stationary phase based on a cellulose derivative, cellulose dodecanoate (DoDC), immobilized onto silica particles to act in the fast and efficient separation of substances that are difficult to analyze in commercial phases. The polymer was synthesized and used as a polymer coating stationary phases, Si(DoDC). The phases were characterized physicochemical and chromatographically. The physicochemical characterization results indicated that the DoDC was synthesized with a cellulose substitution degree of 1.7 and efficiently immobilized onto silica surface. Through a factorial design it was possible to find the best preparation condition of Si(DoDC) phases in terms of polymer load, temperature and immobilization time. Infrared spectra confirmed the presence of the cellulose derivative in Si(DoDC) phase, through C=O and C-H stretches, characteristics of polymer. Scanning Electron Microscopy images indicated that, even after DoDC immobilization on silica, the particles maintained morphological characteristics suitable for particle packaging in stainless steel columns. From the chromatographic analyzes, it was verified that the Si(DoDC) phase acts in reverse phase mode by separation of substances by mechanisms of hydrophobic interactions due to the 12-carbon dodecanoate group. The Si(DoDC) phase presented intrinsic steric selectivity, which can be attributed to cellulose chirality. Si(DoDC) phase was successfully applied in the separation of highly polar drugs, enantiomers of a pharmaceutical compound and positional isomers of the linear alkylbenzene sulfonic anionic surfactant (LAS). In conclusion, the use of cellulose dodecanoate as a stationary phase for high-performance liquid chromatography in reverse phase mode was successful and presents a wide range of possibilities of application in the separation of several classes of compounds.

Keywords: RP-LC, cellulose dodecanoate, thermal immobilization, stationary phases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica: (a) livre ou isolado, (b) geminal, (c) ligação siloxano, (d) vicinal.	17
Figura 2. Cromatograma típico de uma separação cromatográfica de três compostos, em que um não possui retenção na fase estacionária.	24
Figura 3. Estrutura da unidade monomérica da celulose (celobiose).	26
Figura 4. Fórmula estrutural do dodecanoato de celulose.	28
Figura 5. Reação de síntese do dodecanoato de celulose.	31
Figura 6. Coluna em aço inoxidável usadas no trabalho, 50 mm × 4,0 mm d.i.	34
Figura 7. Representação esquemática do sistema de enchimento e esvaziamento de colunas cromatográficas.	34
Figura 8. Estruturas moleculares dos fármacos: (a) hidroclorotiazida, (b) furosemida, (c) cimetidina, (d) famotidina e (e) ranitidina.	43
Figura 9. Estrutura molecular do sulfonato de alquilbenzenos lineares. $x+y = 7$ a 11 unidades CH_2	44
Figura 10. Estruturas moleculares dos isômeros do omeprazol. (a) (R)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-piridin-2-il)metilsulfinil]-3H-benzimidazol e (b) (S)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-piridin-2-il)metilsulfinil]-3H-benzimidazol.	45
Figura 11. Curvas TG para a amostra de DoDC e de celulose.	47
Figura 12. Curvas de primeira e segunda varredura de DSC para o dodecanoato de celulose.....	48
Figura 13. Espectros FTIR para (a) celulose microcristalina e (b) DoDC.	49
Figura 14. RMN de ^1H do dodecanoato de celulose.....	50
Figura 15. Gráfico normal de efeitos para o preparo da fase Si(DoDC). 1= temperatura de imobilização, 2= tempo de imobilização e 3= carga polimérica.....	53
Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura de (a) partículas de sílica e (b) da fase estacionária Si(DoDC) imobilizada termicamente.	54
Figura 17. Curvas termogravimétricas para uma fase Si(DoDC) e para o DoDC.....	55
Figura 18. Isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio na fase Si(DoDC).	56
Figura 19. Espectros FTIR da (a) sílica nua e da (b) fase estacionária Si(DoDC).	58
Figura 20. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(DoDC) preparadas de acordo com o planejamento experimental. (A) fase #1, (B) fase #2, (C) fase #3, (D) fase #4, (E) fase #5, (F) fase #6, (G) fase #7 e (H) fase #8. Condições de análise: fase móvel: MeOH H ₂ O (50:50, v/v), vazão de 0,5 mL min ⁻¹ , temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno e (*) impureza.	60
Figura 21. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pela fase Si(DoDC) #1. Condições de análise: fase móvel: MeOH:H ₂ O (A) 0:100, v/v, (B) 10:90, v/v, (C) 20:80, v/v, (D) 30:70, v/v, (E)	

40:60, v/v, (F) 50:50, v/v, (G) 60:40, v/v, (H) 70:30, v/v, (I) 80:20, v/v, (J) 90:10, v/v, (K) 100:0, v/v. Vazão de 0,5 mL min ⁻¹ , temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) Uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno e (*) impurezas...	63
Figura 22. Separação sucessiva da mistura teste hidrofóbica pela fase Si(DoDC) #1. Condições: fase móvel MeOH:H ₂ O (60:40, v/v), vazão de 0.5 mL min ⁻¹ , detecção UV a 254 nm, temperatura de 25 °C.....	64
Figura 23. Parâmetros de retenção obtidos pelo protocolo de Tanaka para as fases estacionárias Si(DoDC). (A) Fase #1, (B) Fase #2, (C) Fase #5 e (D) Fase #6.....	66
Figura 24. Cromatogramas da separação dos fármacos (1) furosemida, (2) hidroclorotiazida, (3) famotidina, (4) cimetidina e (5) ranitidina pelas fases (a) Si(DoDC) e (b) C ₁₈ . Condições: ACN:Sol. CH ₃ COONH ₄ 0,02 mol L ⁻¹ (40:60, v/v); 1,0 mL min ⁻¹ ; 30 °C, detecção UV 224 nm.	67
Figura 25. Cromatograma da separação do LAS nas fases (a) Si(DoDC)#1 e (b) C ₁₈ comercial. Condições: fase móvel ACN:sol. NH ₄ Ac 0,02 mol L ⁻¹ (40:60, v/v), vazão de 0,5 mL min ⁻¹ , temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação: 1: C10, 2: C11, 3: C12 e 4: C13.....	68
Figura 26. Cromatograma da separação dos isômeros (1) (R)-Omeprazol e (2) (S)-Omeprazol pelas (a) fase Si(DoDC) e (b) pela fase C ₁₈ comercial. Condições: fase móvel MeOH:H ₂ O (60:40, v/v), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura de 30 °C, detecção UV a 224 nm.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados para a otimização do preparo de fases Si(DoDC).	32
Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial 2^3 para a preparação das fases Si(DoDC). Variáveis: T: temperatura, t: tempo de imobilização e C: carga polimérica.	33
Tabela 3. Porcentagem de carbono e eficiência de coluna obtidas para as fases Si(DoDC), de acordo com o planejamento fatorial 2^3	51
Tabela 4. Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na preparação de fases Si(DoDC).	52
Tabela 5. Propriedades morfológicas do suporte cromatográfico antes e após a imobilização térmica do DoDC.	57
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos de desempenho das fases Si(DoDC) preparadas em diferentes condições, de acordo com o planejamento experimental.	61
Tabela 7. Parâmetros de seletividade das fases Si(DoDC) obtidas pelo protocolo de Tanaka.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASAP	Analizador de área superficial e de porosidade (<i>surface area and porosity analyzer</i>)
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FN	Cromatografia líquida de fase normal
CLAE-FR	Cromatografia líquida de fase reversa
MCC	microcrystalline cellulose (celulose microcristalina)
DoDC	Dodecanoato de celulose
DSC	Calorimetria de varredura diferencial (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
E _f	Efeito de uma variável
FE	Fase estacionária
FEQL	Fase estacionária quimicamente ligada
FM	Fase móvel
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier-transform infrared</i>)
k	Fator de retenção
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N	Número de pratos
N/m	Número de pratos por metro
PDMS	poli(dimetilsiloxano)
PMODS	poli(metiloctadecilsiloxano)
PMTDS	poli(metiltetradecilsiloxano)
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
Si(DoDC)	Fase estacionária baseada na imobilização térmica de dodecanoato de celulose sobre sílica
TGA	Análise termogravimétrica
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Reação de esterificação para preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas para cromatografia líquida	19
Equação 2. Etapa de cloração superficial com cloreto de tionila na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas empregando reagente de Grignard	19
Equação 3. Etapa de reação com reagente de Grignard na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas para CLAE-FR	19
Equação 4. Etapa de reação com composto organolítico na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas para CLAE-FR	19
Equação 5. Reação de organossilanização para o preparo de fases quimicamente ligadas	20
Equação 6. Cálculo do tempo de reação ajustado em um cromatograma	24
Equação 7. Cálculo do fator de retenção em um cromatograma	25
Equação 8. Cálculo do fator de separação em um cromatograma	25
Equação 9. Cálculo de resolução em um cromatograma	25
Equação 10. Cálculo do número de pratos em um cromatograma	26
Equação 11. Cálculo da porcentagem de dodecanoato na celulose	36
Equação 12. Cálculo do grau de substituição (GS) da celulose com grupos dodecanoato	37
Equação 13. Cálculo do diâmetro de poros em partículas a partir de medidas de adsorção	40
Equação 14. Cálculo do efeito de uma variável	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Cromatografia líquida de fase normal	15
1.2. Cromatografia líquida de fase reversa	15
1.2.1 Suportes cromatográficos	16
1.2.2 Fases estacionárias quimicamente ligadas	18
1.2.3 Fases estacionárias recobertas com polímeros	20
1.2.3.1 Imobilização polimérica por tratamento térmico	22
1.2.4 Caracterização cromatográfica	23
1.2.5 Celulose e Derivados celulósicos	26
1.2.5.1 Ésteres de celulose	27
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Síntese do dodecanoato de celulose (DoDC)	30
3.2 Preparação das fases estacionárias	31
3.2.1 Ativação da sílica cromatográfica	31
3.2.2 Sorção do dodecanoato de celulose sobre a sílica	31
3.2.3 Imobilização do dodecanoato de celulose sobre a sílica	32
3.2.4 Extração do polímero não imobilizado	33
3.3 Enchimento das colunas cromatográficas	33
3.3.1 Suspensão da fase estacionária	33
3.3.2 Enchimento da coluna com a suspensão da fase estacionária	34
3.3.3 Condicionamento das colunas cromatográficas	35
3.4 Preparação da fase móvel	35
3.5 Caracterização físico-química do DoDC	36
3.5.1 Determinação do grau de substituição (GS)	36
3.5.2 Análise termogravimétrica	37
3.5.3 Calorimetria diferencial de varredura	37
3.5.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho	38
3.5.5 Ressonância magnética nuclear de ^1H	38
3.6 Caracterização físico-química das fases Si(DoDC)	38
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura	39
3.6.2 Análise termogravimétrica	39
3.6.3 Área superficial específica e características de poros	39
3.6.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho	40
3.6.5 Análise Elementar	40
3.7 Caracterização cromatográfica das fases Si(DoDC)	41
3.7.1 Mistura hidrofóbica	41
3.7.2 Misturas testes de Tanaka e colaboradores	41
3.8 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(DoDC)	43

3.8.1 Separação de uma mistura de fármacos	43
3.8.2 Separação dos isômeros do surfactante sulfonato de alquilbenzenos lineares	44
3.8.3 Separação de isômeros espaciais com atividade óptica (enantiômeros)	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Caracterização Físico-Química do polímero DoDC	46
4.1.1 Grau de substituição do DoDC	46
4.1.2 Análise termogravimétrica	46
4.1.3 Calorimetria diferencial de varredura	48
4.1.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho	49
4.1.5 Ressonância magnética nuclear de ^1H	50
4.2 Otimização da imobilização do DoDC sobre partículas de sílica	51
4.3 Caracterização físico-química da fase Si(DoDC)	54
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura	54
4.3.2 Análise termogravimétrica	55
4.3.3 Área Superficial e Análise de Porosidade	56
4.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da fase Si(DoDC)	58
4.4 Caracterização Cromatográfica das fases Si(DoDC)	59
4.4.1 Mistura teste hidrofóbica	59
4.4.2 Estudo da repetibilidade do tempo de retenção dos compostos na fase Si(DoDC)	63
4.4.3 Protocolo teste de Tanaka	64
4.5 Potencialidade de aplicações da fase Si(DoDC)	67
4.5.1 Separação de uma mistura de fármacos	67
4.5.2 Separação dos isômeros do surfactante LAS	68
4.5.3 Separação de isômeros espaciais (enantiômeros) do omeprazol	69
5 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

A invenção da cromatografia é atribuída pelos historiadores ao russo Mikhail Semenovich Tswett tendo como marco a publicação de um relatório preliminar em 1903. Mas sabe-se que existem muitos registros de fenômenos relacionados à cromatografia anteriores a Tswett. Acredita-se que a primeira observação da utilização destes fenômenos seja do historiador romano Caio Plínio Segundo, que viveu entre os anos 23-79 da era cristã. Conhecido como “Plínio, o velho”, era um militar romano naturalista, que devido à sua dedicação ao entendimento dos fenômenos naturais acabou falecendo ao ser atingido por gases tóxicos quando tentou observar a erupção do vulcão Vesúvio, no ano 79, em Pompéia (PACHECO *et al.*, 2015).

O foco dos estudos de Tswett, era a clorofila. Ele utilizava como fase móvel álcool e como fase estacionária papel absorvente sob vácuo. Seus trabalhos o levaram a concluir que o pigmento verde extraído das plantas, continha pelo menos cinco substâncias divididas em dois grupos, as clorofilas e as xantofilas.

A cromatografia líquida com instrumentação de forma rudimentar surge em 1958, com publicação dos pesquisadores Moore e Stein, que demonstram esquematicamente suas instrumentações para a separação de aminoácidos. No início, os sistemas cromatográficos eram chamados de cromatógrafos a líquidos de alta pressão, isto porque os líquidos apresentam viscosidades muito superiores aos gases e, conseqüentemente, altas pressões eram necessárias para mover o líquido através da coluna. Logo, o termo pressão foi substituído por eficiência, e até os dias de hoje o termo é utilizado (PACHECO *et al.*, 2015).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos nos últimos 30 anos. Amplamente usada nas indústrias farmacêuticas, análises ambientais, na medicina e em muitos outros campos da ciência (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Este crescimento se deve à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade; à possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis e, principalmente, ao desenvolvimento de suas fases estacionárias, que vêm possibilitando a ampliação das espécies determináveis por CLAE.

1.1 Cromatografia líquida de fase normal

A cromatografia líquida de fase normal (CLAE-FN) foi a primeira modalidade desenvolvida da CLAE. Nesta modalidade, usualmente emprega-se uma fase estacionária com características mais polares que a fase móvel. O principal material empregado como fase estacionária é a sílica e a alumina, contendo uma camada de um líquido polar em sua superfície como a água, grupamentos amino, diol, etc. A fase móvel normalmente é constituída de uma mistura de solventes orgânicos como hexano e clorofórmio/diclorometano. As interações do analito com a fase estacionária normalmente eram baseadas em interações polares, que proporcionava uma forte retenção de compostos, principalmente polares, tornando o tempo de análise muito longo e picos com caudas muito intensas (PACHECO *et al.*, 2015).

Nos anos 1970, surgiram as denominadas fases quimicamente ligadas (*chemically bonded phases*), as quais possibilitaram o uso de fases estacionárias mais hidrofóbicas e fases móveis baseadas em soluções aquosas, contendo solventes orgânicos miscíveis com água. Esse novo sistema contendo fases estacionárias com grupos apolares ancorados na sílica, logo se tornou popular na análise de biomoléculas, em alimentos e na análise de agrotóxicos, fármacos, entre outras classes de compostos (NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Tal desenvolvimento deu grande impulso à recém desenvolvida cromatografia líquida moderna, instrumental ou, simplesmente, CLAE. Uma vez que o novo sistema utilizava fases móveis mais polares (acetonitrila:água ou metanol:água) do que as fases estacionárias, a ordem de eluição dos compostos era contrária, inversa ou reversa à da cromatografia líquida normal. Assim, foi cunhado o termo *reversed phase* ou fase reversa (FR) para descrever esse tipo de cromatografia líquida no qual a polaridade da fase móvel é maior do que a da fase estacionária.

As fases normais caíram em desuso na década de 70 com o desenvolvimento das fases reversas, por vários motivos, como: baixa repetibilidade das análises, utilização de muito solvente orgânico, forte adsorção de substâncias polares, limite operacional de pH (2 a 8) e dificuldade na separação de amostras iônicas (LANÇAS, 2010).

1.2. Cromatografia líquida de fase reversa

O desenvolvimento da fase reversa trouxe soluções para os problemas encontrados pela CLAE-FN, tornando-se, nos últimos 20 anos a primeira escolha na análise de

moléculas de interesse biológico (aminoácidos, proteínas, fármacos humanos e veterinários), alimentos (carotenóides, açúcares, lipídeos, vitaminas, etc.) e muitos outros campos de aplicação em que se deseja análises de compostos de baixa ou média polaridade (LANÇAS, 2010).

As fases reversas utilizam como fase móvel, solventes menos tóxicos e mais baratos, como água e metanol, (quando comparadas as fases normais, que utilizam clorofórmio e hexano), tendem a adquirir rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; possuem boa reprodutibilidade dos tempos de retenção; possibilidade de eluição por gradiente, resultando em melhor separação e rapidez nas análises (TONHI *et al.*, 2002). São constituídas de um suporte, normalmente um óxido inorgânico e um líquido ligado a este suporte, uma espécie orgânica apolar que pode estar ligada quimicamente, imobilizadas ou apenas sorvidas. As diferentes combinações entre espécies orgânicas e a variedade de óxidos inorgânicos resultam em fases estacionárias com diferentes seletividades, podendo ser aplicadas nas mais variadas áreas (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

1.2.1 Suportes cromatográficos

Para que um material possa ser usado como suporte cromatográfico é necessário que o mesmo possua algumas características que o compatibilize com o sistema cromatográfico da CLAE. O material deve:

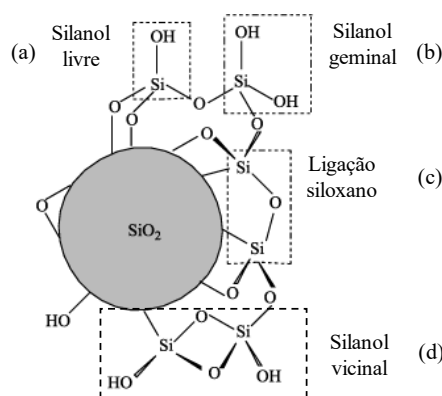
- Ser suficientemente poroso, a fim de permitir que o líquido seja absorvido pelos seus poros;
- Possuir área superficial suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra, normalmente maior que $1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$;
- Possuir diâmetro de poros entre 5 e 100 nm. Poros muito estreitos tornam difícil a transferência de massa, podendo ocorrer efeitos de exclusão por tamanho. Poros muito largos impedem a fixação do líquido estacionário por forças capilares, e, desta forma, o líquido pode ser removido com a passagem da fase móvel;
- Possuir uma alta concentração de grupos ativos em sua superfície para facilitar a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação do mesmo;
- Inércia química, para não reagir com os componentes da amostra;
- Resistência mecânica elevada, a qual seja capaz de resistir às altas pressões aplicadas em CLAE, (MEYER, 2010).

Segundo Trudinger, Muller e Unger (1990), o material utilizado como suporte cromatográfico também deve apresentar um método de síntese das partículas altamente reprodutível e resistir térmica, mecânica e quimicamente à degradação (TRUDINGER; MULLER; UNGER, 1990).

Os primeiros materiais empregados como suporte cromatográfico foram os óxidos inorgânicos de silício (SiO_2 – sílica) e de alumínio (Al_2O_3 – alumina). A sílica, na sua forma amorfa tem sido, desde então, o material mais empregado como suporte. Quase a totalidade das aplicações da CLAE-FR fundamentam-se em suportes à base de sílica (ENGELHARDT; CLAY; SAAR, 2005).

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 m^2/g), 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 amorfa apresenta três grupos silanóis e ligações siloxano (Si-O-Si) em sua superfície, que conferem a estrutura rígida do óxido, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica: (a) livre ou isolado, (b) geminal, (c) ligação siloxano, (d) vicinal.



Fonte: Adaptado de PRADO et al., 2005.

A sílica possui alta atividade química na superfície. Esta atividade depende da concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis e não das ligações siloxano (Zhuravlev, 2000). Com isso, a sílica possui facilidade de modificação superficial através de seus grupos OH, favorecendo a interação com as mais diversas espécies orgânicas e, por consequência, possibilitando diferentes seletividades à fase estacionária.

A concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis na superfície da sílica é altamente dependente do tipo de pré-tratamento (ácido, básico ou térmico) pelo qual a sílica foi submetida. O modelo físico-químico de Zhuravlev, 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 – 190 °C, sob vácuo (FARIA, 2006).

Apesar da sílica possuir inúmeras qualidades desejáveis para ser utilizada como suporte na cromatografia líquida, a sílica possui duas importantes limitações que impedem maiores aplicações da CLAE-FR. A primeira limitação restringe a sua utilização em uma faixa de pH 2 a 8, para que não ocorra sua dissolução. Em meio fortemente ácido, pH menor que 2, os grupos orgânicos ligados à sílica são mais facilmente lixiviados, pois as ligações $\equiv\text{Si-O-Si-C}$ responsáveis por manter esses grupos imobilizados, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Em meio básico, com pH maior que 8, a exposição da fase móvel com a parte do suporte que não reagiu com o grupo orgânico (silanóis residuais) promove a dissolução da sílica e, conseqüentemente, a perda do líquido estacionário e a deterioração do leito cromatográfico (SILVA *et al.*, 2004).

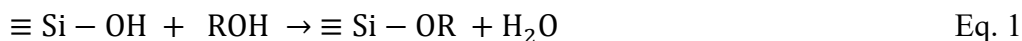
O segundo problema é que apenas 50 % dos grupos silanóis são capazes de se ligar quimicamente aos modificadores orgânicos tradicionais (C_8 ou C_{18} , por exemplo) na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR, por problemas de impedimento estérico devido ao grande volume das moléculas C_{18} , restando um grande número de silanóis residuais que podem alterar o mecanismo de separação da fase estacionária (NAHUM; HORVATH, 1981). Uma vez presentes nas fases estacionárias à base de sílica, os grupos silanóis residuais apresentam elevada acidez e é possível que eles interajam fortemente com compostos básicos, resultando em uma adsorção reversível com picos cromatográficos assimétricos, dificultando a quantificação dos compostos ou, até mesmo, em uma adsorção irreversível restringindo a transferência de massa, devido ao bloqueio de alguns sítios de interação hidrofóbica (TONHI *et al.*, 2002). Este problema está associado principalmente às fases quimicamente ligadas.

1.2.2 Fases estacionárias quimicamente ligadas

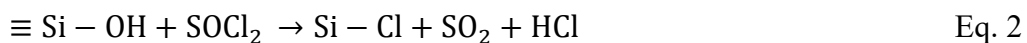
O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência está associado ao desenvolvimento da tecnologia de preparo das fases estacionárias. Este desenvolvimento

foi impulsionado pela introdução das fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL) para a cromatografia líquida da modalidade de fase reversa. Antes de surgirem esses novos materiais, quimicamente ligados, o recheio da coluna cromatográfica era constituído de um líquido estacionário de baixa massa molar apenas sorvido ao suporte cromatográfico. A manutenção da concentração constante do líquido estacionário no suporte se mostrava difícil e ineficiente com o emprego de vazões mais altas da fase móvel e não era possível realizar separações no modo de eluição por gradiente, as quais eram frequentemente desejadas para separação de misturas complexas (KIRKLAND, 2004).

A introdução de uma camada quimicamente ligada ao suporte cromatográfico tem como finalidade unir as propriedades dos grupos orgânicos (como a rigidez e a estabilidade térmica) com as propriedades de rigidez e morfológicas do óxido inorgânico. Um dos primeiros métodos utilizados para esta finalidade foi a reação de esterificação, a qual envolve a reação de um álcool com o grupo silanol superficial da sílica, como mostrada na Equação 1. Este método foi rapidamente abandonado porque a ligação $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{C}$ é muito instável hidroliticamente e não pode ser utilizada com fases móveis aquosas ou alcoólicas (QIU *et al.*, 2011).

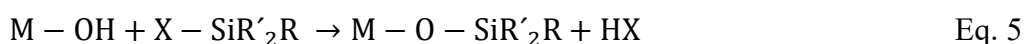


Outro método utilizado para o preparo de fases estacionárias quimicamente ligadas foi a reação por cloração seguida de reação com o reagente de Grignard. Neste método, o processo consiste de uma etapa de cloração superficial com cloreto de tionila (Equação 2), seguida pela ligação da cadeia alquila através de um reagente de Grignard (Equação 3) ou por um composto organo-lítio (Equação 4).



A ligação $\equiv \text{Si} - \text{C}$ tem maior estabilidade que as ligações Si-O-Si-R , formada na reação de organossilanização, entretanto o uso do reagente de Grignard ou o composto organo-lítio na síntese torna este procedimento economicamente inviável (TONHI *et al.*, 2002).

A organossilanização é um dos métodos mais usados atualmente para (FEQL), para sua realização é necessário ativar os grupos hidroxilas da superfície do óxido através de aquecimento, removendo as moléculas de água ligadas à superfície por ligações de hidrogênio. Em seguida, promove-se a reação entre um organossilano monofuncional e os grupos hidroxilas superficiais, como mostrado na Equação 5. (TONHI *et al.*, 2002).



Em que: M = Si, Al, Zr ou Ti; X-SiR'₂R = agente organossilano; X = cloreto ou grupo alcóxido (etóxi ou metóxi); R = cadeia alifática, como C₈ ou C₁₈, e; R' = -CH₃.

Em fase reversa R representa as cadeias C₈ e C₁₈, que são os reagentes mais utilizados, no entanto sendo que cadeias de C₂ a C₃₀ são também encontradas. Utiliza-se grupos terminais ciano ou amino ligados a uma cadeia alifática para a modalidade de cromatografia de fase normal. As fases assim produzidas são comumente chamadas fases “tipo escova”, devido à disposição do grupo alifático perpendicular à superfície do suporte cromatográfico (SPUDEIT *et al.*, 2014).

As fases estacionárias quimicamente ligadas tem demonstrado algumas limitações ao longo do tempo, como baixa eficiência e estabilidade a longo prazo, tornando a vida útil da fase estacionária menor; Além de recobrimento, em muitos casos, inadequado evidenciando grupos silanóis residuais.

1.2.3 Fases estacionárias recobertas com polímeros

O objetivo de produzir fases com polímeros recobrindo um suporte é combinar 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 preparação destas fases estacionárias recobertas tem sido bem sucedida, levando a separação de diversas classes de compostos em condições de pH da fase móvel fora da faixa de segurança das fases quimicamente ligadas (FARIA *et al.*, 2008).

A seletividade das fases estacionárias imobilizadas por polímeros depende essencialmente do tipo de grupos funcionais presentes na cadeia lateral do polímero

imobilizado. Devido à disponibilidade de diversos polímeros com diferentes funcionalidades comercialmente, as fases recobertas com polímeros permitem um ajuste flexível da seletividade cromatográfica dentro de uma ampla faixa, dependendo apenas da escolha do grupo funcional do polímero. Dentre os polímeros já estudados para a finalidade de separação cromatográfica, estão: polibutadieno (MORAIS; JARDIM, 2005); poliestireno (FIGGE *et al.*, 1986); poli(2-fenilpropil)metilsiloxano (BEGNINI, 2011); poli(óxido de etileno-*co*-dimetilsiloxano) (CARVALHO, 2017); poli(metiltetradecilsiloxano) (NOME, 2014); e poli(metiloctadecilsiloxano) (SILVA JUNIOR, 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, recobrando-o apenas por mecanismos de adsorção e, posteriormente, evapora-se o solvente (JARDIM; COLLINS K; COLLINS C, 2004). Outra forma é a polimerização de monômeros *in situ*, ou seja, a polimerização de monômeros sobre a superfície e poros do suporte de óxido inorgânico (MAO; FUNG, 1997). Este último método é menos vantajoso, pois além de usar reagentes químicos (mais caros e mais tóxicos) ainda apresenta dificuldade em controlar a espessura do recobrimento polimérico sobre o suporte (NAZARIO; LANÇAS, 2013).

Posteriormente ao recobrimento polimérico, pode-se realizar alguns processos para a imobilização do polímero sobre o suporte, como por exemplo, através da reticulação com reagentes químicos (ligações entrecruzadas) (CHEN *et al.*, 2004), tratamento térmico (CARVALHO, 2017), radiação ionizante (ANAZAWA, 1992) ou ainda promover a ligação covalente entre o polímero e o suporte, produzindo uma monocamada ancorada, neste último caso, o polímero deve apresentar grupos funcionais específicos ou reativos para se ligar ao suporte (KATAEV *et al.*, 1994). Estas imobilizações possuem a finalidade de fixar o polímero na superfície do suporte, impedindo que o mesmo seja lixiviado com a passagem da fase móvel (SILVA JUNIOR, 2014).

A imobilização de polímeros sobre um suporte poroso é um processo complexo, influenciado pela contribuição dos diferentes tipos de interações entre o suporte e o polímero, entre as moléculas adjacentes na superfície do suporte e, também, pela reatividade dos grupos funcionais e sua porosidade (TONHI *et al.*, 2002). Além disso, 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 (BOTOLLI *et al.*, 2002). Logo, o processo de imobilização polimérica é um fator crucial para a obtenção de fases estacionárias eficientes para CLAE-FR.

1.2.3.1 Imobilização polimérica por tratamento térmico

O princípio da imobilização térmica baseia-se no aquecimento por condução de calor, em que o recipiente contendo a fase estacionária sorvida (com o polímero apenas depositado sobre o suporte cromatográfico) é aquecido e, em seguida, ocorre à transferência de calor para a amostra. O tratamento térmico é empregado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes cromatográficos, auxiliando no processo de auto imobilização. A auto imobilização é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário um longo período, dependendo do tipo de fase e de suporte, para que ocorra o rearranjo das moléculas do polímero na forma de uma camada estável sobre a superfície dos poros do suporte (CARVALHO; COLLINS; FARIA, 2016).

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 (BOTOLLI, 2002; FARIA 2006).

Diversos trabalhos empregando o tratamento térmico foram realizados para a preparação de fases estacionárias imobilizadas com polímeros (CARVALHO, 2017). Dentre os polímeros mais estudados, os polissiloxanos com cadeias laterais alquilas alifáticas são os mais explorados na preparação de fases reversas para CLAE, como o PMODS, PMTDS, PMOS e PDMS. Apesar de bem sucedidas em várias aplicações as fases estacionárias a base de polissiloxanos de cadeias alquilas laterais imobilizados termicamente sobre a sílica possui hidrofobicidade relativamente elevada, comparáveis às fases C₁₈ quimicamente ligadas, que as tornam inapropriadas para a separação de algumas substâncias mais hidrofóbicas e ou de moléculas maiores, por resultarem em tempos de análise demasiadamente longos e fases móveis com alto teor de solvente orgânico, gerando

resíduos tóxicos e elevando o custo das análises. Neste trabalho buscamos estudar, um polímero natural, biodegradável e com características hidrofílicas que pudesse resultar em um recobrimento de fase estacionária capaz de analisar substâncias difíceis de serem analisadas pelas fases estacionárias comerciais.

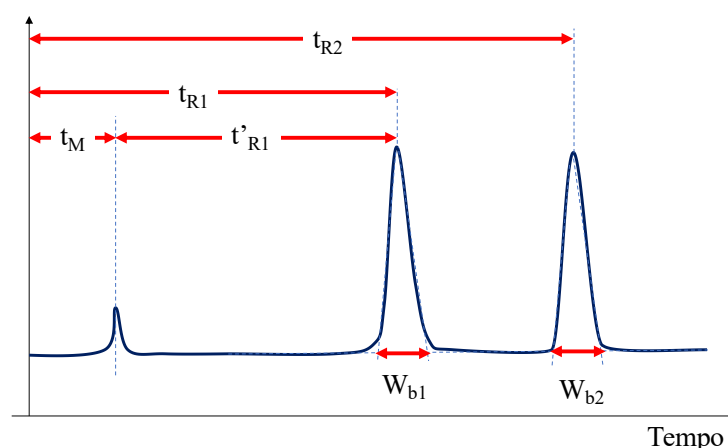
1.2.4 Caracterização cromatográfica

A grande popularidade das fases reversas levou ao desenvolvimento de novos materiais para o preenchimento de colunas cromatográficas para CLAE. São muitas as possibilidades de escolha o que torna difícil saber qual a melhor fase estacionária para resolver um determinado problema. Com isso, faz-se necessária uma caracterização completa da fase estacionária a fim de evidenciar suas propriedades físico-químicas e, principalmente, de retenção para avaliar a sua melhor condição de aplicação.

Técnicas instrumentais para a caracterização das fases estacionárias tais como os espectroscópicos, microscópicos e termogravimétricos são frequentemente empregados pois fornecem informações importantes sobre as partículas de fases estacionárias. No entanto, as informações fornecidas por estas técnicas não permitem inferir sobre a separação cromatográfica das substâncias, além de requererem o esvaziamento da coluna cromatográfica para realização dos testes, levando à desestruturação do leito cromatográfico. Desta forma, testes com o leito cromatográfico intacto e que possibilite uma análise real das propriedades de interação da fase estacionária não são possíveis com técnicas instrumentais. Assim, misturas testes padrão, contendo compostos com características químicas selecionadas, são empregadas para avaliar as propriedades de retenção das fases estacionárias mediante interações intermoleculares entre estes compostos, a fase estacionária e a fase móvel, sem a necessidade de desestruturação do leito cromatográfico (FARIA, 2006). Existem várias misturas testes padrão recomendadas para a avaliação das características de retenção de fases estacionárias para a CLAE. Dentre os protocolos de avaliação cromatográfica de fases estacionárias mais importantes, podem ser destacados os propostos por Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989), por Engelhardt e Jungheim (ENGELHARDT; JUNGHEIM, 1990), por Neue e colaboradores (NEUE *et al.*, 1999), pelo National Institute of Standards and Technology (SANDER; WISE, 2002). Estes protocolos contém um conjunto de compostos agrupados em uma ou mais misturas que, após submetidos à separação pela fase estacionária em teste, permitem avaliar características de seletividade e de retenção do material de separação.

As informações obtidas pela separação das misturas testes são baseadas nos parâmetros cromatográficos extraídos dos picos dos compostos nos cromatogramas. Cada protocolo avalia um conjunto determinado de propriedades, no entanto, de uma forma geral fazem uso dos parâmetros básicos da cromatografia que são apresentados nas equações 6 a 10, e calculados a partir dos picos nos cromatogramas, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Cromatograma típico de uma separação cromatográfica de três compostos, em que um não possui retenção na fase estacionária.



Fonte: próprio autor

De acordo com a Figura 2, o primeiro pico no cromatograma refere-se 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 de retenção para um composto não retido na fase estacionária. O tempo de retenção de um determinado composto (t_{R1}) é o tempo gasto pelo composto para percorrer todo o sistema cromatográfico. O tempo de retenção de um composto é constituído pelo tempo que ele permanece retido na fase estacionária (t'_{R1} ou tempo de retenção ajustado – Equação 6) e o tempo que ele é movimentado pela fase móvel (t_M), (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

$$t'_R = t_R - t_M$$

Eq. 6

A velocidade de um composto pelo sistema cromatográfico pode ser medida pelo fator de retenção, k . O fator de retenção (Equação 7) é determinado pela razão do tempo

que o composto permanece na fase estacionária (t'_R) pelo tempo que se movimenta com a fase móvel (t_M), portanto, quanto mais lenta for a saída do composto da coluna cromatográfica, maior será seu fator de retenção, pois maior será o tempo de retenção ajustado (MEYER, 2010).

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{Eq. 7}$$

A separação entre dois compostos na cromatografia pode ser medida por dois parâmetros: fator de separação (α) ou pela resolução entre picos (R_s). Em ambos os casos os parâmetros levam em consideração o grau de separação entre dois picos adjacentes nos cromatogramas. Considerando os picos do cromatograma da Figura 2, tem-se as equações 8 e 9 para o fator de separação e a resolução, respectivamente. O fator de separação é medido pela razão entre os fatores de retenção dos dois picos, portanto, considera apenas os tempos de retenção dos picos. A resolução é uma medida mais real da separação entre dois picos no cromatograma, já que considera além dos tempos de retenção dos picos, o alargamento dos mesmos, (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(t_{R2} - t_M)}{(t_{R1} - t_M)} \quad \text{Eq. 8}$$

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad \text{Eq. 9}$$

A separação adequada de dois compostos, sem sobreposição de dois picos adjacentes no cromatograma ocorrerá sempre que a Resolução entre estes picos for maior que 1,25. Assim, resoluções inferiores a 1,25 indicam separação inadequada de dois picos no cromatograma.

O alargamento de um pico além de afetar a separação entre compostos adjacentes no cromatograma afeta também a sua eficiência, isto é, o número de pratos (N) de uma determinada coluna cromatográfica recheada com uma fase estacionária. O N é uma medida da capacidade de eluição de um composto em uma fase estacionária sem que haja alargamento de pico. Um prato é o resultado de uma etapa de equilíbrio estabelecida entre o composto, a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de equilíbrios na coluna cromatográfica maior é o número de pratos, portanto, mais eficiente será a separação (mais fino o pico cromatográfico no cromatograma). O número de pratos é

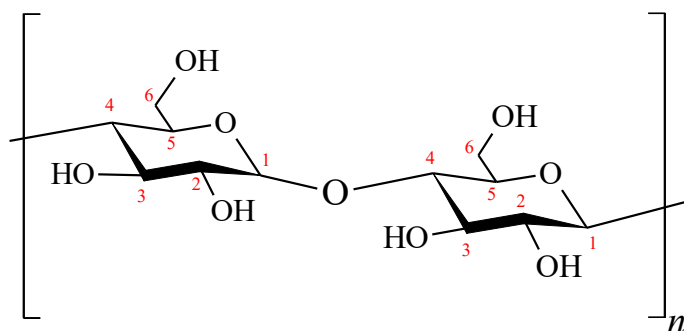
calculado de acordo com a Equação 10, relacionando o tempo de retenção (t_R) do composto e a largura da base de seu pico (W_b) no cromatograma, (MEYER, 2010).

$$N = 16 \frac{(t_R)^2}{(W_b)^2} \quad \text{Eq. 10}$$

1.2.5 Celulose e Derivados celulósicos

A celulose é uma das substâncias orgânicas mais abundantes no planeta, sendo o principal constituinte da fibra vegetal, e pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes (DONINI *et al.*, 2010). A molécula de celulose, possui um arranjo linear de unidades de D-glicose conectadas por ligação β -1,4:[C₆H₁₀O₅]_n e possuem três grupos hidroxilas disponíveis que fazem ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 3), aspecto que torna a celulose um polímero linear, fibroso e que apresenta baixa solubilidade em água (WILLBERG-KEYRILAINEN *et al.*, 2016).

Figura 3. Estrutura da unidade monomérica da celulose (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), como por exemplo, na preparação dos ésteres de celulose, que foi explorada no presente trabalho.

Como o uso da celulose diretamente 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 material da fase estacionária para CLAE.

1.2.5.1 Ésteres de celulose

Os ésteres de celulose de ácidos orgânicos foram compostos pioneiros na química da celulose e são os derivados celulósicos com maior interesse em diferentes aplicações técnicas. O interesse em converter celulose em ésteres de celulose surgiu primeiro porque a celulose se decompõe antes do seu ponto de fusão e, também, porque a celulose é insolúvel em água e na maioria dos solventes devido às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares em sua estrutura molecular.

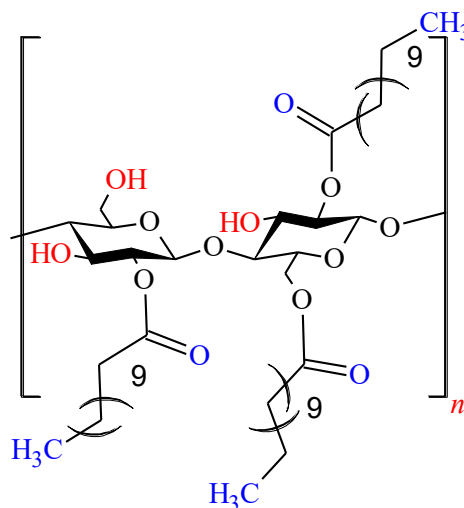
A conversão da celulose em ésteres de celulose resulta, portanto, em materiais que podem ser processados no estado fundido ou podem ser solubilizados em uma grande gama de solventes. Ésteres de celulose como o acetato de celulose e os ésteres mistos de acetato propionato de celulose e acetato butirato de celulose são os mais estudados para as mais diversas finalidades, inclusive estando disponíveis comercialmente em diferentes graus de substituição e composição (KOSAKA, 2007).

A produção dos derivados pode ser realizada através de reações em fase heterogênea e homogênea. Em muitos processos a etapa inicial da reação é o inchamento das fibras promovido pela inserção de reagentes que interagem fortemente com os grupos hidroxila da celulose. As reações de modificação da celulose podem ocorrer nas três hidroxilas disponíveis nos carbonos 2, 3 e 6 (Figura 3). Assim, o grau de substituição da síntese varia de 1 a 3 dependendo da acessibilidade e reatividade da reação (CRÉPY *et al.*, 2011).

A introdução de grupos acila na estrutura molecular da celulose leva à quebra das ligações de hidrogênio, e modifica sua solubilidade, tornando o polímero compatível com inúmeras aplicações, incluindo como recobrimento polimérico para fases estacionárias de cromatografia líquida de fase reversa. Neste trabalho, a modificação da celulose através da acetilação com um grupamento de cadeia alquila intermediária ao C₈ e C₁₈ foi idealizado para buscar um material de seletividade adequada para a separação de compostos de cadeia longa, porém sem a utilização de fases móveis com alto teor de solvente orgânico e com tempos mais curtos de análises. O dodecanoato de celulose, Figura 4, pode resultar em um material de seletividade com estas características na separação, bem como propiciar um material de fase estacionária de mais baixo custo e mais ampla facilidade de preparação.

Adicionalmente, segundo Szabó e colaboradores (1984) fases estacionárias que contenham 12 ou 14 átomos de carbono em sua cadeia lateral proporciona, de uma forma geral, as propriedades ótimas para separações no modo de fase reversa com boa eficiência, estabilidade, picos simétricos e características apropriadas de retenção.

Figura 4. Formula estrutural do dodecanoato de celulose.



Fonte: próprio autor.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma fase estacionária de sílica recoberta com dodecanoato de celulose para cromatografia líquida de alta eficiência no modo de fase reversa, que apresentasse fácil preparação e com características adequadas de retenção para atuar na separação de substâncias difíceis de serem separadas por CLAE-FR.

Objetivos específicos:

- Síntese do derivado celulósico, dodecanoato de celulose (DoDC), a partir da acetilação da celulose microcristalina com cloreto de dodecanoíla.
- Preparação das fases estacionárias reversas, empregando o método de evaporação estática do solvente e posterior tratamento térmico para a imobilização do (DoDC) sobre micropartículas de sílica;
- Otimização das condições de imobilização das fases estacionárias para a obtenção de uma fase Si(DoDC) com maior recobrimento da superfície do suporte e melhor desempenho cromatográfico, empregando planejamento fatorial;
- Enchimento de colunas de aço inoxidável de 50 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, com as fases estacionárias preparadas;
- Avaliação das características de retenção das fases estacionárias através da separação de misturas-teste padrão;
- Caracterização físico-química e morfológica da fase estacionária Si(DoDC) otimizada;
- Aplicação da fase Si(DoDC) otimizada na separação de misturas complexas como: fármacos altamente polares, isômeros espaciais de fármacos com atividade óptica e série de homólogos de um surfactante aniônico com cadeias alquilas lineares variando de C₁₀ a C₁₃.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

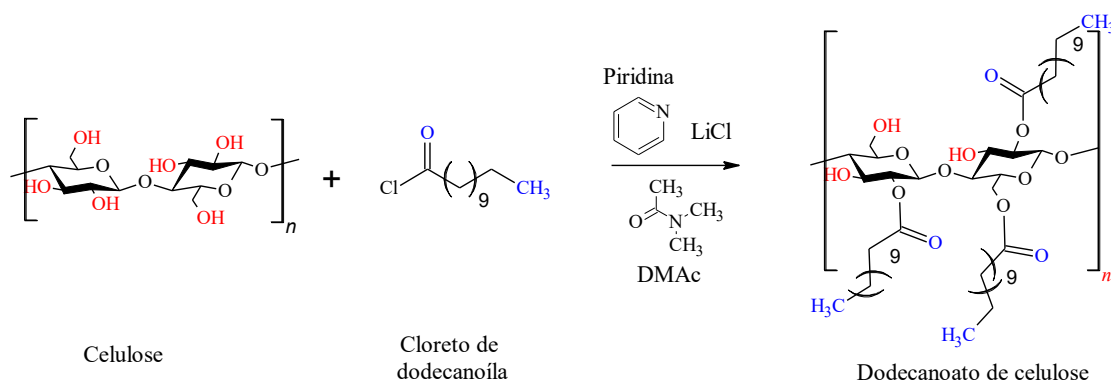
3.1 Síntese do dodecanoato de celulose (DoDC)

A síntese do dodecanoato de celulose (DoDC) foi realizada inicialmente por via heterogênea, como descrito por Abdalla e Ragab (2014), em que a celulose não se dissolve no meio reacional. Foram adicionados 2,0000g de celulose micro cristalina (MCC) em 16,00 mL de piridina em um béquer sob agitação em banho de gelo, ($\sim 5^{\circ}\text{C}$), e, em seguida, foram adicionados gota-a-gota 32 ml uma mistura na proporção 1:1 de cloreto de dodecanoíla e dimetilacetamida (DMAc), durante 15 min, permanecendo posteriormente por mais 10 min sob agitação. Posteriormente, a mistura foi deixada em repouso por 48 h a 8°C em um refrigerador.

Após as 48 h, a mistura reacional foi transferida para outro béquer contendo água destilada resfriada, formando um precipitado amarelo, que foi filtrado em funil de placa de vidro sinterizado. O precipitado foi submetido a uma série de lavagens, em sequência com etanol, água destilada resfriada, acetona e novamente água destilada resfriada. A secagem do precipitado foi realizada à temperatura ambiente, 28°C por 24 h e em estufa a 50°C por 48 h. Para garantir um grau de substituição mais elevado dos grupos hidroxilas da celulose com o grupamento dodecanoato, o material seco foi submetido a uma nova etapa de síntese.

Para esta nova etapa, foi montado um sistema de refluxo adicionando a um balão de 250 mL, cerca 2,0000 g do material sintetizado e 67,00 mL de DMAc. O sistema foi deixado sob refluxo e agitação a 120°C por 2 h. Após este período, a temperatura foi reduzida para 100°C , sendo adicionados 4,800 g de cloreto de lítio, mantendo a reação de síntese por mais 1 h a 100°C . Após esse período, o refluxo foi interrompido mantendo o sistema apenas sob agitação à temperatura ambiente por uma noite. No dia seguinte, foram adicionados gota-a-gota ao balão sob agitação 32 ml uma mistura na proporção 1:1 de cloreto de dodecanoíla e dimetilacetamida (DMAc). O sistema foi levado ao refrigerador a 8°C e deixado por 48 h. Após este período o material foi filtrado, lavado sequencialmente com metanol, água resfriada, acetona e água resfriada e seco, conforme realizado na etapa de síntese anterior. Ao final deste processo, o material sólido obtido foi o dodecanoato de celulose (DoDC), empregado como recobrimento polimérico de fases estacionárias para CLAE. Na Figura 5 esta apresentada a reação de síntese para o polímero DoDC.

Figura 5. Reação de síntese do dodecanoato de celulose.



3.2 Preparação das fases estacionárias

3.2.1 Ativação da sílica cromatográfica

A ativação da sílica cromatográfica foi realizada para remover as moléculas de água adsorvidas na superfície do suporte e deixar seus grupos silanóis superficiais ativos para receber a camada polimérica. Para isso, foram pesados 6,000 g de sílica ChromoSorb (Varian, Palo Alto, CA, EUA) com partículas de 5 μm de diâmetro e 100 Å de poros e submetidos a aquecimento a 140 °C por 12 h. A sílica ativada foi colocada em dessecador sob vácuo para resfriamento e deixada em repouso até o momento do uso.

3.2.2 Sorção do dodecanoato de celulose sobre a sílica

A sorção do dodecanoato de celulose, DoDC, sobre a sílica foi realizada pelo método da evaporação estática do solvente (JARDIM; COLLINS K; COLLINS C, 2004). Resumidamente, em um béquer de 50 mL foram adicionados 0,400 g ou 0,240 g do DoDC em 15 mL de tolueno e deixado em agitação magnética branda por 10 min até a total dissolução do polímero. Após este período, foram adicionados 0,800 g de sílica pré-ativada ao béquer, mantendo a agitação branda durante 2 h e 30 min, sendo periodicamente submetida a um banho ultrassom por 10 min, para evitar a agregação das partículas, retornando para a agitação magnética em seguida.

Após este período, o béquer foi retirado da agitação, fechado com papel alumínio contendo pequenos furos e deixado em capela à temperatura ambiente (~ 27 °C), sem

agitação, para a evaporação total do solvente. O material seco obtido foi denominado de fase estacionária sorvida, Si(DoDC).

3.2.3 Imobilização do dodecanoato de celulose sobre a sílica

A etapa de imobilização térmica sobre as partículas de sílica é de extrema importância na preparação das fases estacionárias, pois aumenta a intensidade da interação do polímero com o suporte, “fixando-o” mais fortemente na superfície e poros da sílica e evitando a sua lixiviação com a passagem contínua de fase móvel.

A fase Si(DoDC) sorvida foi submetida à imobilização térmica sob diferentes condições de tempo, temperatura e carga polimérica em dois níveis cada, empregando um planejamento fatorial 2^3 . Os níveis de cada um dos fatores avaliados na imobilização térmica do DoDC sobre a sílica estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados para a otimização do preparo de fases Si(DoDC).

Variável		Nível baixo (-)	Nível alto (+)
T	Temperatura de imobilização (°C)	100	120
t	Tempo de imobilização (h)	8	16
C	Carga polimérica de DoDC (% m/m)	30	50

A partir das variáveis selecionadas e seus níveis, foi construída a matriz do planejamento fatorial 2^3 , que apresenta a combinação de todas as condições experimentais para a preparação de fases estacionárias Si(DoDC). Na Tabela 2 estão apresentados os experimentos realizados para otimização do preparo da fase Si(DoDC).

Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial 2³ para a preparação das fases Si(DoDC). Variáveis: T: temperatura, t: tempo de imobilização e C: carga polimérica.

Experimentos	Variáveis		
	T	t	C
1	—	—	—
2	+	—	—
3	—	+	—
4	+	+	—
5	—	—	+
6	+	—	+
7	—	+	+
8	+	+	+

3.2.4 Extração do polímero não imobilizado

Após a imobilização térmica do polímero no suporte de sílica sob as diferentes condições, as fases estacionárias foram submetidas a etapas de lavagens sucessivas, com a finalidade de retirar o polímero que não ficou imobilizado sobre a sílica. As fases estacionárias Si(DoDC) secas e imobilizadas foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados cerca de 3 mL de tolueno, e submetidos ao agitador vórtex por 1 min e subsequentemente à centrifugação por 4 min a 2500 r.p.m. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, repetindo a lavagem do material. Após a lavagem, o material sólido foi levado à estufa a 60 °C por 1 hora para secagem da fase. O material sólido seco obtido foi denominado de fase estacionária Si(DoDC) imobilizada termicamente.

3.3 Enchimento das colunas cromatográficas

3.3.1 Suspensão da fase estacionária

As colunas cromatográficas foram preenchidas com as fases Si(DoDC), utilizando equipamento adequado para esta finalidade em suspensão e sob alta pressão. Para o enchimento das colunas, foram preparadas suspensões da fase Si(DoDC) em clorofórmio a 10 % (m/v) em tubos de ensaio rosqueáveis. O clorofórmio foi utilizado por ser um solvente de densidade adequada para impedir a deposição de partículas da fase estacionária, deixando-as suspensas no solvente mesmo quando em repouso. Os tubos de

ensaio foram deixados sob agitação branda por 12 h em um homogeneizador multifuncional tipo Roller (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

3.3.2 Enchimento da coluna com a suspensão da fase estacionária

As fases estacionárias preparadas foram empregadas no recheio de tubos de aço inoxidável de formato cilíndrico com 50 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, Figura 6.

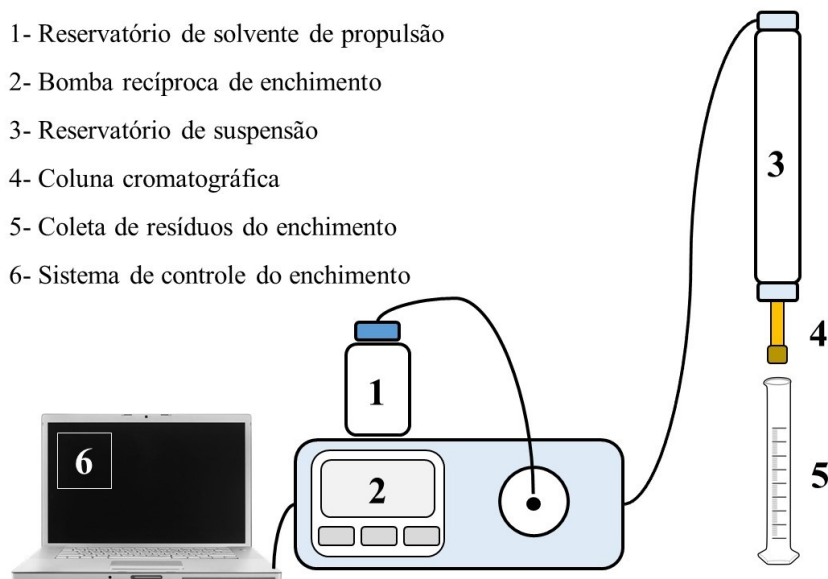
Figura 6. Coluna em aço inoxidável usadas no trabalho, 50 mm $\times$ 4,0 mm d.i.



Fonte: <https://www.chromservis.eu/p/synergi-4-m-hydro-rp-80a-hplc-column-250-x-4-6-mm>

A suspensão da fase Si(DoDC) em clorofórmio foi submetida ao enchimento das colunas cromatográficas sob alta pressão, de acordo com o esquema da Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática do sistema de enchimento e esvaziamento de colunas cromatográficas.



Fonte: Carvalho, 2017.

Conforme ilustrado na Figura 7, o reservatório do solvente propulsor (1) foi preenchido com metanol previamente filtrado. Em seguida, a pressão da bomba (2) foi ajustada para 9.000 psi, com vazão de solvente de 23 mL min^{-1} por 10 minutos. A coluna cromatográfica de 50 mm comprimento x 4,0 mm de diâmetro (4) foi conectada a extremidade inferior do reservatório de suspensão (3). A FE em suspensão contida no tubo de ensaio rosqueável foi então vertida no reservatório de suspensão (3) e o reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio). A extremidade superior do reservatório de solvente foi fechada. Com o sistema todo fechado, a bomba foi ligada propulsionando o solvente (metanol) para o reservatório de suspensão que levou a suspensão da FE para o interior da coluna, ficando retida devido à presença de um filtro com diâmetro de poro de $2 \mu\text{m}$, na extremidade inferior da coluna.

O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de 80 mL de solvente, que foi recolhido em uma proveta de 100 mL (5), colocada logo abaixo do sistema de enchimento. Esse volume é equivalente a duas vezes a capacidade do reservatório da suspensão. Após o término do enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal.

3.3.3 Condicionamento das colunas cromatográficas

A coluna cromatográfica previamente recheada com a fase Si(DoDC) foi conectada ao cromatógrafo a líquido Varian com sistema binário de bombeamento ProStar 210 e detector UV/vis ProStar 325 (Palo Alto, CA, EUA), passando fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50 (v/v) e vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, por cerca de 60 min ou até estabilizar a linha de base do cromatograma.

3.4 Preparação da fase móvel

Todos os solventes que foram empregados como fases móveis neste trabalho foram filtrados individualmente, utilizando-se um sistema de filtração de fase móvel e uma membrana de Nylon de 47 mm de diâmetro e $0,22 \mu\text{m}$ de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados separadamente em frascos de vidro e colocados por 5 min em banho de ultrassom, para serem desgaseificados e posteriormente usados no sistema cromatográfico.

3.5 Caracterização físico-química do DoDC

Após a síntese do dodecanoato de celulose DoDC, avaliou-se o grau de substituição da celulose no material obtido. Este parâmetro é especialmente importante para este trabalho porque é necessário que o polímero tenha um grau de substituição adequado para ser solúvel em um solvente orgânico (tolueno ou clorofórmio ou hexano) que seja, posteriormente, evaporado lentamente, promovendo uma adsorção organizada sobre as partículas de sílica. O DoDC foi também caracterizado físico-quimicamente empregando as técnicas de análise termogravimétrica (TG), Calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H .

3.5.1 Determinação do grau de substituição (GS)

Em um béquer de 100 mL foram pesados 0,100 g de dodecanoato de celulose. Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução padronizada de NaOH a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e 5 mL de etanol, deixando a mistura em repouso. Após 24 horas, foram adicionados 10 mL de uma solução padronizada de HCl a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ao béquer, sendo deixada em repouso por 30 min. A solução resultante foi titulada com uma solução padronizada de NaOH a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma solução de fenolftaleína a 1 % (m/v) como indicador. O procedimento foi realizado em triplicata e o grau de substituição da celulose foi determinado a partir das Equações 11 e 12.

$$\% \text{DoDC} = \frac{183,310 \times [C_{\text{NaOH}} (V_{\text{tit}} + V_{\text{ad}}) - C_{\text{HCl}} V_{\text{HCl}}]}{m_{\text{DoDC}}} \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

Em que:

% DoDC: Porcentagem de grupos dodecanoato;

C_{NaOH} : Concentração de NaOH padronizada;

V_{tit} : Volume de NaOH gasto na titulação;

V_{ad} : Volume de NaOH adicionado na amostra;

V_{HCl} : Volume de HCl adicionado;

C_{HCl} : Concentração de HCl padronizado;

m_{DoDC} : Massa pesada da amostra de dodecanoato de celulose.

Massa molecular do DoDC: $183,310 \text{ g mol}^{-1}$

A partir da % DoDC, calculou-se o GS do DoDC pela Equação 12.

$$\text{GS} = \frac{162,14 \times \% \text{DoDC}}{183,310 \times (100 - \% \text{DoDC})} \quad \text{Eq. 12}$$

Em que:

Massa molecular da celulose ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$): $162,14 \text{ g mol}^{-1}$;

% DoDC: Porcentagem de grupos dodecanoato inseridos na celulose.

3.5.2 *Análise termogravimétrica*

Para a avaliação da estabilidade térmica do polímero DoDC, (dodecanoato de celulose) e da celulose microcristalina, foi utilizada a técnica de análise termogravimétrica, 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 a 600°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. As medidas foram realizadas sob atmosfera inerte (sob fluxo de nitrogênio), em um analisador termogravimétrico modelo DTG-60H, marca Shimadzu (Quioto, Japão), no qual foi medida a percentagem de perda de massa do DoDC e da celulose microcristalina de acordo com o aumento da temperatura. Essa medida foi realizada no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ/UFU).

3.5.3 *Calorimetria diferencial de varredura*

A análise térmica foi realizada em um calorímetro diferencial de varredura (DSC, *differential scanning calorimetry*) da TA Instruments modelo Q20 (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 placas de alumínio hermeticamente fechadas, foram pesados cerca de 10 mg de DoDC. A placa 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°C e, em seguida, a amostra foi resfriada. O segundo ciclo de

aquecimento ocorreu até 140 °C. Estas medidas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

3.5.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A caracterização dos principais grupos funcionais da celulose microcristalina e do dodecanoato de celulose foi realizada por meio do preparo de pastilhas de KBr com uma pequena porção de DoDC por prensagem manual, na proporção de 1:100 (DoDC:KBr) na região espectral 400 a 4000 cm^{-1} em espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100 (Tóquio, Japão), com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. As caracterizações por espectroscopia de absorção na região do infravermelho das amostras estudadas foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do Curso de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal (ICENP)/UFU.

3.5.5 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A caracterização estrutural do dodecanoato de celulose para confirmação da modificação da celulose com os grupos dodecanoíla foi realizada por RMN de ^1H em um Bruker Ascend™ 400 (400 MHz) (Karlsruhe, Alemanha). As amostras foram preparadas pela dissolução de 40 mg do DoDC, previamente seco, em 0,5 mL de CDCl_3 . Os deslocamentos químicos do espectro do RMN de ^1H foram definidos pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0 (zero) ppm. O espectro unidimensional de RMN de ^1H foi realizado a temperatura ambiente (27 °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.

3.6 Caracterização físico-química das fases Si(DoDC)

As caracterizações físico-químicas da fase Si(DoDC) foram realizadas na amostra denominada Si(DoDC) #7, preparada de acordo com as condições para o experimento 7 do planejamento de experimentos. A escolha desta fase para o estudo de caracterização físico-química ocorreu de acordo com a disponibilidade de realização das medidas instrumentais. Considerando que a caracterização se trata de uma análise qualitativa e que as fases Si(DoDC), otimizada ou não, apresentam características físico-químicas aproximadamente

iguais, a não utilização da fase Si(DoDC) otimizada para o estudo não apresenta perda de informação significativa.

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) avalia, por meio de micrografias, a morfologia das partículas de sílica imobilizadas com o DoDC. Nesta técnica, as partículas foram fixadas em porta-amstras 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.

Os porta-amstras foram introduzidos em um microscópio eletrônico de varredura TESCAN (Tóquio, Japão) com microsonda de raios-X. As imagens das partículas de Si(DoDC) foram obtidas com diferentes ampliações. Essa medida foi realizada no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

3.6.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada para avaliação da estabilidade térmica da fase estacionária Si(DoDC), empregando o mesmo procedimento descrito no item 3.5.2.

3.6.3 Área superficial específica e características de poros

As fases Si(DoDC) foram analisadas quanto às suas características morfológicas de área superficial específica e porosidade. Aproximadamente 10 mg de foram submetidas a um pré-tratamento a 90 °C por 4 h sob vácuo com taxa de aquecimento de 1° C min⁻¹. Em seguida, as amostras analisadas em um equipamento ASAP 2010 Analyzer (Micromeritics, Norcross, GA, EUA). Estas medidas foram obtidas através da adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET (Brummet, Elmer e Teller) (GREGG; SING,1982) a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressões de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poros foi determinado pelo método do ponto único através da conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos

valores de volume total de poros e da área superficial BET, conforme Equação 13. Esta medida foi realizada no Laboratório Multiusuários da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/UFU).

$$d_p = \frac{4 V_p}{S_{BET}} \quad \text{Eq. 13}$$

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

3.6.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho

A fase estacionária Si(DoDC) foi caracterizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho para identificação dos principais grupos funcionais do dodecanoato de celulose no material, confirmando a sua imobilização nas partículas de sílica. A análise do material foi realizada por meio de pastilhas de KBr na proporção de 1:100 (Si(DoDC):KBr) na região espectral 400 a 4000 cm^{-1} em um espectrofotômetro Jasco modelo FTIR 4100, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.6.5 Análise Elementar

As fases Si(DoDC) preparadas em diferentes condições foram submetidas à análise elementar para a determinação da porcentagem de carbono, tornando possível avaliar o grau de recobrimento da superfície do suporte cromatográfico pelo polímero, dodecanoato de celulose, uma vez que o carbono presente no material é proveniente apenas do DoDC. O método consiste na combustão do material seco, convertendo os elementos da amostra em gases simples, como CO_2 , H_2O e N_2 . Estes gases são submetidos a condições exatas de pressão, temperatura e volume. Posteriormente, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Foi empregado um analisador elementar PerkinElmer, modelo 2400 (Norwalk, CT, EUA). Essa medida foi realizada no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

3.7 Caracterização cromatográfica das fases Si(DoDC)

As fases estacionárias Si(DoDC) foram submetidas à separação de misturas testes padrão para caracterização de suas propriedades de retenção cromatográfica. As misturas testes avaliadas neste trabalho são protocolos bem estabelecidos e conhecidos na literatura comumente empregados na avaliação de fases estacionárias comerciais ou produzidas em laboratório e a também a um teste de repetibilidade (KIMATA *et al.*, 1989; CRUZ *et al.*, 1997).

3.7.1 Mistura hidrofóbica

A primeira avaliação cromatográfica das fases Si(DoDC) foi realizada a partir da separação de uma mistura teste, denominada de Mistura Teste Hidrofóbica, composta pela uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. A mistura teste hidrofóbica foi empregada para avaliar a modalidade da cromatografia líquida, a partir da ordem de eluição de seus compostos, e a seletividade das fases estacionárias. A mistura teste hidrofóbica foi usada também na determinação das melhores condições de análise para a fase Si(DoDC), como composição e vazão da fase móvel, e na avaliação da repetibilidade dos tempos de retenção dos compostos na fase Si(DoDC).

3.7.2 Misturas testes de Tanaka e colaboradores

O protocolo teste de Tanaka (KIMATA *et al.*, 1989) se trata de uma série de misturas-teste analisada em diferentes condições de fases móveis e utilizadas para a caracterização das propriedades de retenção de fases estacionárias no modo de fase reversa.

O protocolo é constituído de quatro misturas testes, cada uma com composição de fase móvel específica e que avalia diferentes características de retenção de compostos nas fases estacionárias sob análise. Todas as misturas foram analisadas empregando uma vazão de fase móvel de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 μL .

O protocolo de Tanaka é composto por quatro misturas:

- Mistura I: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenilo e trifenileno. Composição da fase móvel: MeOH: H₂O (80:20, v/v);

- Mistura II: uracila, cafeína e fenol. Composição da fase móvel: MeOH: H₂O (30:70, v/v);
- Mistura III: uracila, benzilamina e fenol. Composição da fase móvel: MeOH:tampão fosfato K₂HPO₄/KH₂PO₄ a pH 7,60 (30:70, v/v);
- Mistura IV: uracila, benzilamina e fenol. Composição da fase móvel: MeOH:tampão fosfato H₃PO₄/KH₂PO₄ a pH 2,70 (30:70, v/v).

Com a utilização do protocolo proposto por Tanaka e colaboradores as propriedades cromatográficas avaliadas nas fases estudadas foram:

- Hidrofobicidade (k_{PB}) – Medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno na mistura A. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da camada orgânica da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento da superfície da fase estacionária.
- Seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) – Medida pela razão dos 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 compostos orgânicos durante a separação, pois a seletividade hidrofóbica mede o grau de separação de alquilbenzenos distintos por um grupo CH₂.
- Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$) – Medida pela razão entre os 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 estruturas químicas similares, porém que diferem quanto à sua geometria e disposição espacial.
- Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$) – Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C/k_P$. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis na fase estacionária que estão aptos a formarem ligações de hidrogênio com componentes da amostra.
- Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60}$) – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,60} = k_B/k_P$, empregando fase móvel tamponada em pH 7,60. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da fase estacionária.
- Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70}$) – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,70} = k_B/k_P$, empregando fase móvel tamponada em pH 2,70. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária.

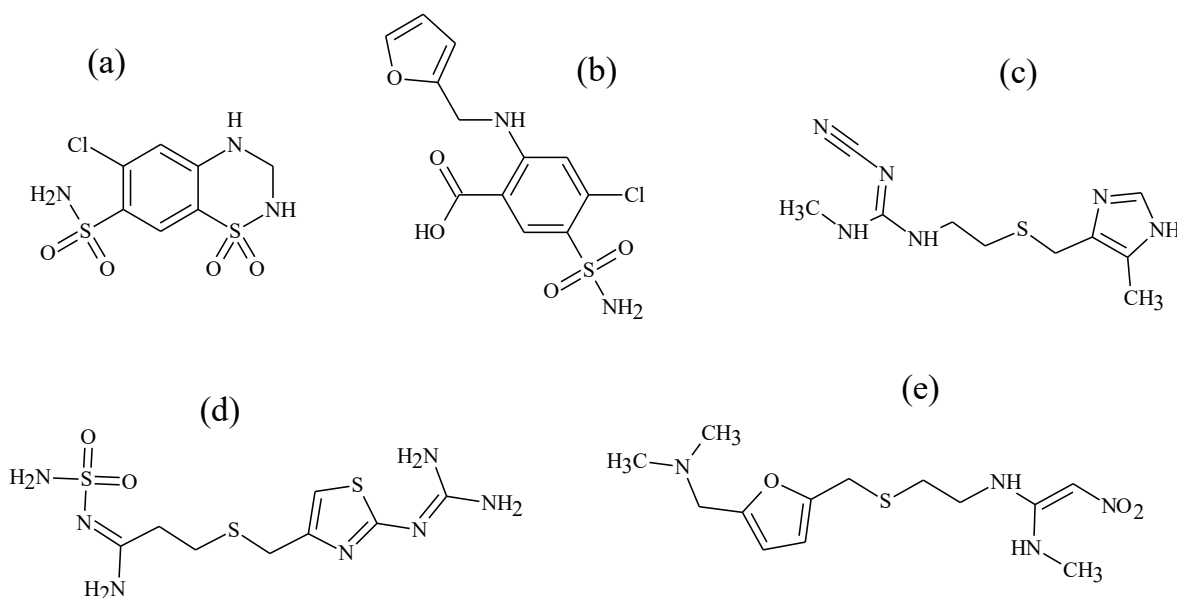
3.8 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(DoDC)

3.8.1 Separação de uma mistura de fármacos

A aplicabilidade da fase Si(DoDC) foi avaliada na separação de substâncias altamente polares como a mistura contendo os fármacos hidroclorotiazida (pKa >9,1), furosemida (pKa 9,8), cimetidina (pKa 13,4), famotidina (pKa 9,3) e ranitidina (pKa 7,8). Estes compostos apresentam baixa retenção em fases estacionárias convencionais disponíveis comercialmente, tornando-se difíceis as análises pela CLAE-FR. Para este estudo a fase Si(DoDC) #1 foi utilizada em uma coluna de 150 × 4,6 mm. Para a separação foi empregada uma fase móvel acetonitrila:solução de CH₃COONH₄ a 0,02 mol L⁻¹, na proporção 40:60 (v/v), com uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C e detecção UV a 224 nm. Soluções padrões individuais dos fármacos foram injetadas individualmente para a confirmação do tempo de retenção. A separação obtida pela fase Si(DoDC) foi comparada à obtida por uma fase comercial C₁₈, sob condições idênticas de análise.

As estruturas moleculares dos fármacos avaliados neste estudo são apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Estruturas moleculares dos fármacos: (a) hidroclorotiazida, (b) furosemida, (c) cimetidina, (d) famotidina e (e) ranitidina.

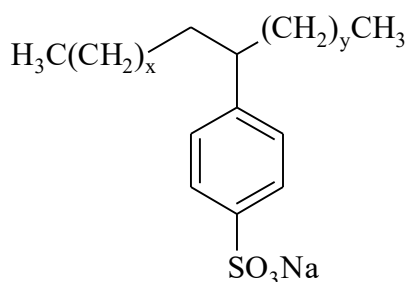


Fonte: Próprio autor.

3.8.2 Separação dos isômeros do surfactante sulfonato de alquilbenzenos lineares

O LAS é um tensoativo aniônico, amplamente usado em detergentes industriais, constituído de uma mistura de isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C₁₀ a C₁₆, com predominância de C₁₀ a C₁₃, conforme estrutura química apresentada na Figura 9.

Figura 9. Estrutura molecular do sulfonato de alquilbenzenos lineares. $x+y = 7$ a 11 unidades CH₂



Fonte: Próprio autor.

A fase Si(DoDC)#1 foi empregada na separação dos isômeros do LAS na tentativa de avaliar sua seletividade estérica, ou seja, a capacidade de separar isômeros, principalmente de cadeias longas. A separação foi realizada com fase móvel metanol:H₂O (50:50, v/v), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, coluna de 150 × 4,6 mm, temperatura de 30 °C e detecção UV a 254 nm e para comparação utilizou-se uma coluna do mesmo tamanho, com fase estacionária comercial C₁₈.

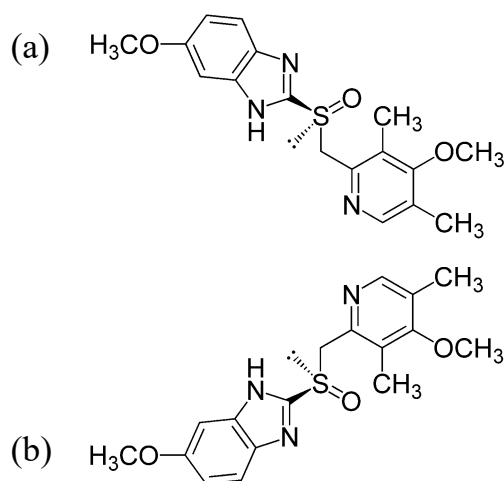
3.8.3 Separação de isômeros espaciais com atividade óptica (enantiômeros)

A aplicabilidade da fase Si(DoDC) foi avaliada também na separação de uma mistura racêmica de compostos opticamente ativos (enantiômeros) do fármaco omeprazol, Figura 10.

O omeprazol é um benzimidazol substituído, inibidor da bomba de prótons, que existe como uma mistura racêmica dos isômeros R e S. O esomeprazol é o isômero S do omeprazol e o primeiro inibidor da bomba de prótons a ser desenvolvido como um isômero único para o tratamento de doenças relacionadas a acidez do sistema gástrico. Assim como o omeprazol, o esomeprazol demonstra uma inibição altamente eficaz da secreção ácida gástrica. No entanto, o esomeprazol difere do omeprazol ao apresentar menor metabolismo

hepático de primeira passagem e depuração plasmática mais lenta, resultando em concentrações plasmáticas mais elevadas. O aumento da biodisponibilidade sistêmica do esomeprazol oferece a perspectiva de melhor eficácia clínica e manejo mais efetivo de doenças relacionadas à acidez do sistema gástrico (LIND *et al.*, 2000). Assim, a importância de separar os isômeros e preparar formulações com maior proporção do esomeprazol é uma necessidade dificilmente encontrada com os materiais de separação convencionais.

Figura 10. Estruturas moleculares dos isômeros do omeprazol. (a) (R)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-piridin-2-il)metilsulfinil]-3H-benzimidazol e (b) (S)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetil-piridin-2-il)metilsulfinil]-3H-benzimidazol.



Fonte: Wikipedia.org

A possibilidade de separação dos isômeros do omeprazol foi avaliada em uma coluna de $150 \times 4,6$ mm recheada com a fase Si(DoDC) #1, empregando fase móvel metanol:água 60:40 (v/v), com uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 30°C e detecção UV a 224 nm. A separação obtida pela fase preparada neste trabalho foi comparada com a obtida por uma coluna comercial C_{18} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Físico-Química do polímero DoDC

Para avaliar se a síntese do polímero DoDC ocorreu de forma bem sucedida, foram realizadas algumas caracterizações físico-químicas como: análise termogravimétrica (TG), Calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e Ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H).

4.1.1 Grau de substituição doo DoDC

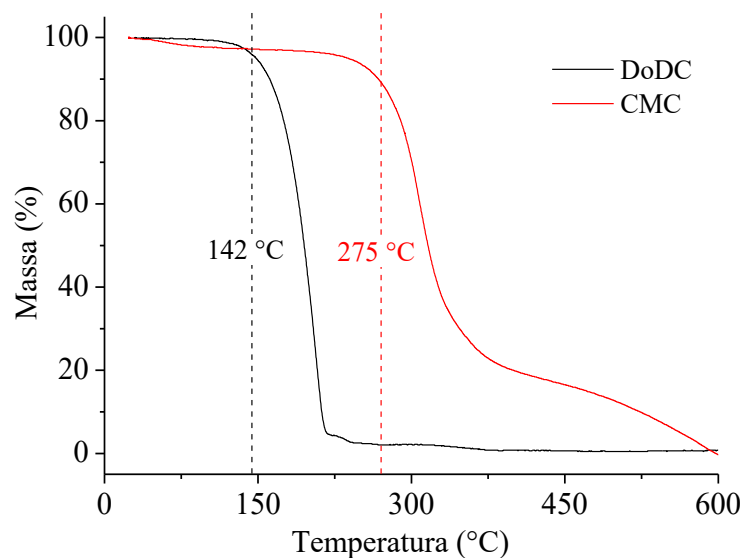
O grau de substituição (GS) do dodecanoato de celulose é o número médio de grupos dodecanoíla que substituem as hidroxilas da celulose por unidade glicosídica, o qual pode variar de zero (nenhum grupo inserido) à 3 (inserção de grupos em todas hidroxilas da unidade glicosídica). O GS (Eq. 12) é um parâmetro de extrema importância, pois afeta a cristalinidade do polímero, o potencial de biodegradabilidade e a solubilidade em diferentes solventes, entre outras propriedades. Por exemplo, celulose (GS = 0) é insolúvel na maioria dos solventes, mas ao se aumentar o GS do derivado celulósico DoDC a solubilidade se altera. Para um GS = 0,33 o polímero DoDC se torna solúvel em piridina e benzeno, para um GS = 2,76 o polímero se torna solúvel em tolueno, DMAc, DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (dimetilformamida), THF (tetraidrofurano), entre outros (FREITAS, 2016).

O resultado obtido para o dodecanoato de celulose sintetizado neste trabalho foi de GS = 1,7, indicando um elevado grau de substituição da celulose, o que possibilitou sua solubilidade em tolueno, empregado como solvente tradicional na preparação de fases estacionárias reversas.

4.1.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica do DoDC e os possíveis eventos de sua degradação, permitindo definir o intervalo de temperatura de imobilização do DoDC sobre o suporte de sílica. A curva termogravimétrica do DoDC é apresentada na Figura 11.

Figura 11. Curvas TG para a amostra de DoDC e de celulose.



Fonte: próprio autor.

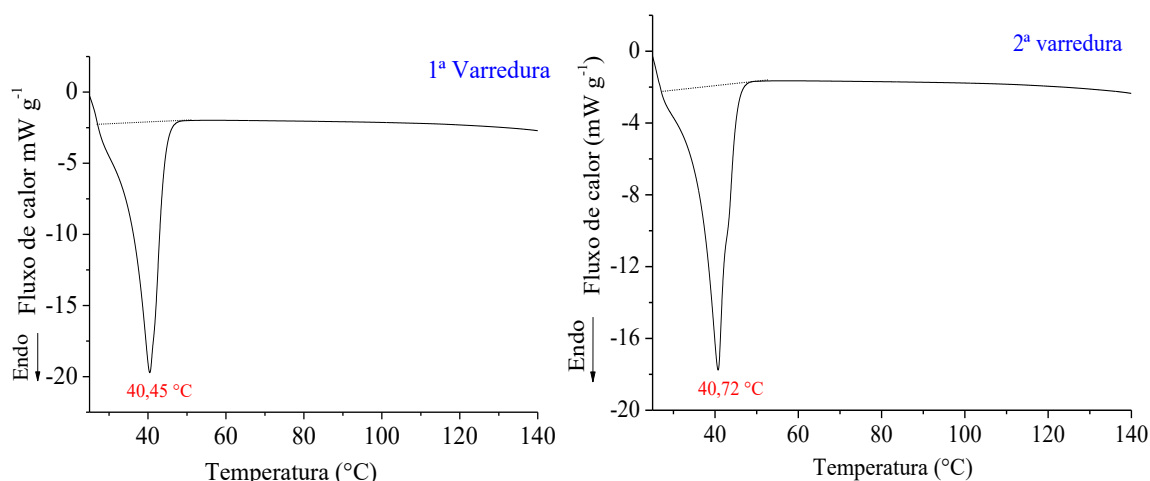
A celulose apresenta dois eventos térmicos típicos: i) entre 25 e 150 °C, atribuído a volatilização de água adsorvida no material celulósico, e; ii) entre 275 °C a 400 °C, com uma perda de massa de 90 %. Este último processo é atribuído a ruptura das ligações da cadeia principal que levam à decomposição da celulose, deixando um resíduo carbonáceo de cerca de 10% na temperatura de 550 °C. Já na curva TG para o dodecanoato de celulose é possível identificar dois eventos térmicos na faixa de 25 a 600 °C. Observa-se o primeiro evento térmico entre 25 e 150 °C, referente a processos de desidratação do polímero, com perda de aproximadamente 1 % de massa. O DoDC é um material mais hidrofóbico que a celulose pura, o que justifica a menor perda de massa proveniente da desidratação quando se comparam os dois materiais. O segundo evento térmico, que se inicia na temperatura de 142 °C, é possivelmente atribuído a ruptura das ligações dos grupos laterais dodecanoatos ligados às unidades de glicose da cadeia celulósica principal. Guo (2012) observou que derivados celulósicos acilados com cloreto de acila de cadeia entre 8 a 16 átomos apresentam um evento térmico com temperatura inicial de decomposição entre 209 e 215 °C para amostras com grau de substituição inferior a 0,50. Abdala e Ragab (2014) observaram, para uma amostra de dodecanoato de celulose com grau de substituição de 2,76, uma queda no valor da temperatura inicial de decomposição para 120 °C. O valor encontrado neste trabalho se encontra entre as temperaturas informadas para os derivados acilados condizente com o GS de 1,7, sendo inferior ao esperado para decomposição da celulose sem modificação, confirmando a acilação da celulose. Esta diminuição na

temperatura de decomposição do derivado celulose quando comparamos com a temperatura de decomposição da celulose pura, ocorre porque é necessário mais energia térmica para degradar a celulose, enquanto o derivado rompe a estrutura da celulose, facilitando a degradação. A partir da temperatura de 375 °C ocorre a mineralização do material.

4.1.3 Calorimetria diferencial de varredura

A análise do dodecanoato 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. Na Figura 12 estão apresentadas as curvas de DSC do dodecanoato de celulose.

Figura 12. Curvas de primeira e segunda varredura de DSC para o dodecanoato de celulose.



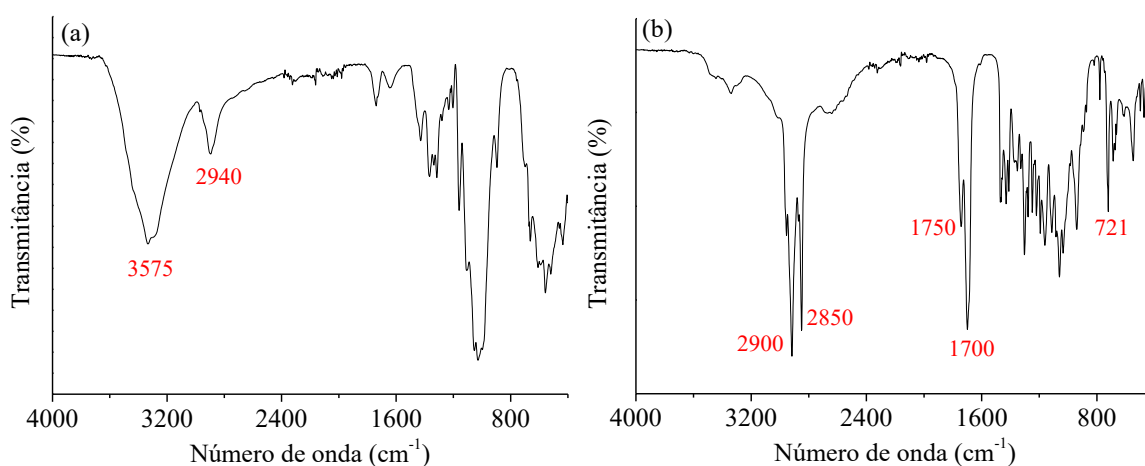
Fonte: próprio autor.

A primeira varredura mostra uma pequena perda de água, também observada na curva TG, apresentada na Figura 11, e um pico endotérmico relacionado à fusão do dodecanoato de celulose. A temperatura de fusão registrada foi de 40,45 °C e a entalpia de fusão obtida de 118,1 J g⁻¹. Esta temperatura de fusão do DoDC é interessante para a imobilização térmica sobre partículas de sílica, pois nas condições empregadas para a imobilização, o dodecanoato de celulose, na forma líquida, permitirá uma melhor acomodação do mesmo na superfície e poros da sílica, fornecendo um melhor recobrimento do suporte.

4.1.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho

O DoDC foi caracterizado por espectroscopia de absorção no infravermelho para a identificação dos sinais referentes ao grupamento dodecanoíla e à celulose, avaliando, dessa forma, a eficiência da esterificação da celulose. A Figura 13 apresenta os espectros de absorção no infravermelho para a celulose e o derivado celulósico DoDC.

Figura 13. Espectros FTIR para (a) celulose microcristalina e (b) DoDC.



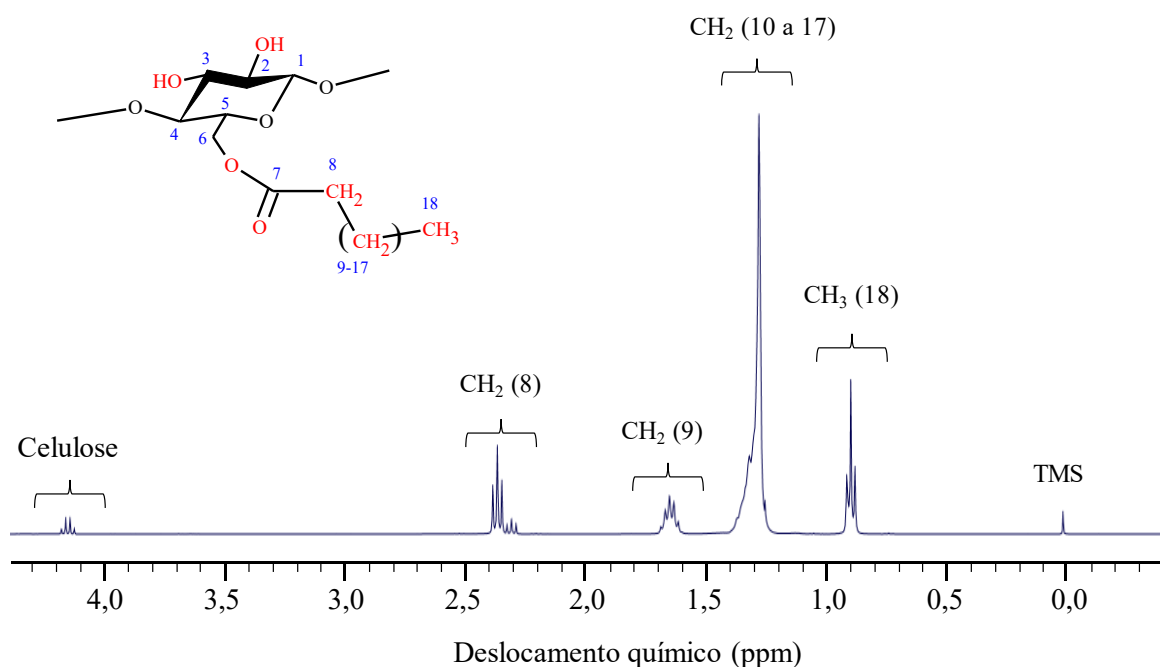
Fonte: próprio autor.

De acordo com a Figura 13, o espectro FTIR para o dodecanoato de celulose apresenta uma significativa diferença quanto ao perfil se comparado ao espectro da celulose microcristalina (não modificada), confirmando a modificação da celulose. Observa-se que a banda intensa em 3575 cm^{-1} no espectro da celulose microcristalina, atribuída ao estiramento O-H, é praticamente inexistente no espectro do DoDC. Este fato fornece indícios de que a modificação ocorreu pelos grupos OH da celulose. Além disso, o estiramento C=O de carbonila, em 1750 cm^{-1} no espectro de DoDC indica evidências da esterificação da celulose. A ocorrência de picos em torno de $2830\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de ésteres de celulose é atribuída ao estiramento C-H de grupos CH_2 e CH_3 , associados à substituição da celulose pelos grupos dodecanoíla. A banda em torno de 721 cm^{-1} é indicadora da existência de, pelo menos, quatro grupos $(-\text{CH}_2)$ linearmente concentrados e balanceados na estrutura do derivado celulósico. Abdala e Ragab (2014) consideram esta banda como característica do polímero dodecanoato de celulose.

4.1.5 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A informação estrutural do produto obtido da síntese do dodecanoato de celulose foi realizada por RMN de ^1H . A Figura 14 apresenta o espectro de RMN de ^1H de uma amostra de dodecanoato de celulose.

Figura 14. RMN de ^1H do dodecanoato de celulose.



Fonte: próprio autor.

De acordo com o espectro de RMN de ^1H , o sinal registrado em 4,1 ppm é atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos 1 a 6 da estrutura da celulose. O duplo tripleto em 2,4 ppm está associado ao grupo CH₂ (carbono 8 da estrutura do DoDC), enquanto que em 1,7 ppm é registrado um multipeto associado ao CH₂ do carbono 9 do DoDC. O sinal intenso em 1,3 ppm está associado aos grupamentos CH₂ dos carbonos 10 a 17 da estrutura do DoDC. É registrado ainda no deslocamento de 0,9 ppm o sinal referente ao grupo CH₃ do carbono 18 do dodecanoato de celulose. Dessa forma, os sinais registrados no espectro de RMN de ^1H confirmam a estrutura do dodecanoato de celulose, que será empregado como recobrimento polimérico de fases estacionárias para CLAE-FR.

4.2 Otimização da imobilização do DoDC sobre partículas de sílica

O polímero DoDC sintetizado foi então empregado na preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência no modo de fase reversa a partir do método de imobilização térmica sobre partículas de sílica cromatográfica. A preparação das fases estacionárias, Si(DoDC), foi otimizada para a obtenção de materiais com alto grau de recobrimento polimérico das partículas de sílica. As variáveis estudadas na otimização do preparo das fases estacionárias Si(DoDC) foram: a temperatura de imobilização, o tempo de imobilização e a carga polimérica de DoDC. Estas variáveis foram otimizadas a partir de um planejamento fatorial de três variáveis em dois níveis cada uma, planejamento 2^3 . As respostas avaliadas neste estudo foram: (i) a porcentagem de carbono, que indica a quantidade de DoDC imobilizado sobre a sílica, e; (ii) o número de pratos (N/m), que indica a eficiência da fase Si(DoDC) na separação de compostos.

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento de experimentos realizada para a otimização do processo de preparo de fases Si(DoDC) para CLAE-FR com os resultados de porcentagem de carbono e o número de pratos para cada uma das fases preparadas.

Tabela 3. Porcentagem de carbono e eficiência de coluna obtidas para as fases Si(DoDC), de acordo com o planejamento fatorial 2^3 .

Fases	Variáveis							% C	N/m
	T	t	C	T×t	T×C	t×C	T×t×C		
#1	–	–	–	+	+	+	–	9,66	6.200
#2	+	–	–	–	–	+	+	4,78	2.600
#3	–	+	–	–	+	–	+	2,74	5.200
#4	+	+	–	+	–	–	–	9,57	1.700
#5	–	–	+	+	–	–	+	5,81	4.500
#6	+	–	+	–	+	–	–	12,32	4.900
#7	–	+	+	–	–	+	–	6,42	3.800
#8	+	+	+	+	+	+	+	7,86	-

Com os resultados obtidos da porcentagem de carbono foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis no preparo das fases estacionárias Si(DoDC). Os efeitos foram calculados através da diferença entre as médias aritméticas da porcentagem de carbono em cada nível para cada variável, de acordo com a Equação 14.

$$E_f = \overline{\%C_{(+)}} - \overline{\%C_{(-)}} \quad \text{Eq. 14}$$

Em que E_f é o efeito da variável; $\overline{\%C_{(+)}}$ é a porcentagem média de carbono no nível alto da variável e $\overline{\%C_{(-)}}$ é a porcentagem média de carbono no nível baixo da variável.

Como os experimentos não foram realizados em replicatas, o erro dos efeitos não pôde ser estimado a partir de variâncias individuais dos experimentos. Desta forma, o erro dos efeitos foi estimado pela análise do gráfico normal dos efeitos, no qual os efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são considerados estatisticamente significativos. Para construir o gráfico normal de efeitos foram calculadas também todas as interações entre os fatores, resultando no total de sete efeitos: três efeitos principais, três interações de dois fatores e uma interação de três fatores. Para o cálculo dos efeitos de interação de variáveis, multiplicam-se os sinais dos níveis de elemento a elemento. Primeiro, as interações das variáveis são determinadas pela multiplicação dos níveis de duas a duas e, depois, das três variáveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), obtendo-se a matriz apresentada na Tabela 3. Os valores de efeito (E_f) para cada interação foram calculados de forma similar ao cálculo de efeito para as variáveis principais (Equação 14). Os efeitos obtidos para cada variável e suas interações estão apresentados na Tabela 4.

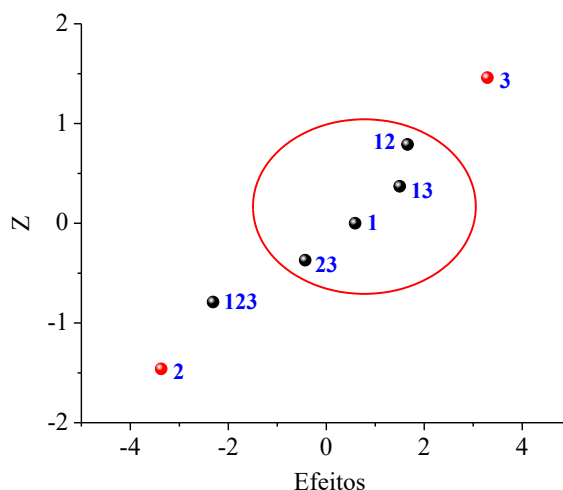
Tabela 4. Efeitos das variáveis estudadas e suas interações na preparação de fases Si(DoDC).

	Variáveis	Efeitos
1	Temperatura (°C)	+0,59
2	Tempo de imobilização (h)	-3,37
3	Carga polimérica (% m/m)	+3,29
12	Temperatura × tempo	1,66
13	Temperatura × carga polimérica	1,50
23	Tempo × carga polimérica	-0,43
123	Temperatura × tempo × carga	-2,31

De acordo com os valores de efeito, a temperatura de imobilização, dentro dos níveis estudados (100 a 120 °C), apresentou a menor influência imobilização de DoDC sobre a sílica. O tempo de imobilização e a carga polimérica apresentaram efeitos similares na imobilização de DoDC. O sinal negativo do efeito do tempo de imobilização indica que

o nível baixo possui maior influência na imobilização do polímero sobre a sílica, ou seja, quanto menor o tempo de imobilização maior é a quantidade de DoDC imobilizado sobre a sílica. A significância dos efeitos do tempo de imobilização e da carga polimérica pode ser confirmada pelo gráfico normal dos resíduos, Figura 15.

Figura 15. Gráfico normal de efeitos para o preparo da fase Si(DoDC). 1= temperatura de imobilização, 2= tempo de imobilização e 3= carga polimérica.



Fonte: próprio autor.

Os valores de efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são estatisticamente significativos, e aqueles que se aproximam deste valor não possuem influência significativa na resposta. Conforme pode ser observado na Figura 15 os pontos vermelhos (2 e 3, tempo e carga polimérica, respectivamente) nas extremidades são os mais dispersos e, por isso, são os dois únicos significativos para o preparo das fases Si(DoDC). No círculo estão os valores de efeito menos significativos, sendo uma variável discreta (temperatura de imobilização) e as demais interações entre as variáveis. Apesar da interação das três variáveis não estar inclusa no círculo, sua significância não foi considerada, pois quanto maior é o número de interações das variáveis, menor seu efeito no experimento.

O tempo de imobilização (ponto 2) se encontra na área negativa do gráfico normal dos efeitos, indicando que o nível baixo (8 h) proporcionou melhor resultado para a imobilização do DoDC sobre a sílica. Já a carga polimérica (ponto 3) ocorreu o contrário, sua presença na região positiva do gráfico indica que o nível alto (50 %, m/m) foi mais significativo para a imobilização da fase Si(DoDC). A temperatura de imobilização, por

não ter efeito significativo na imobilização, dentro das condições estudadas, pode ser definida como qualquer valor entre 100 e 120 °C para a preparação da fase Si(DoDC).

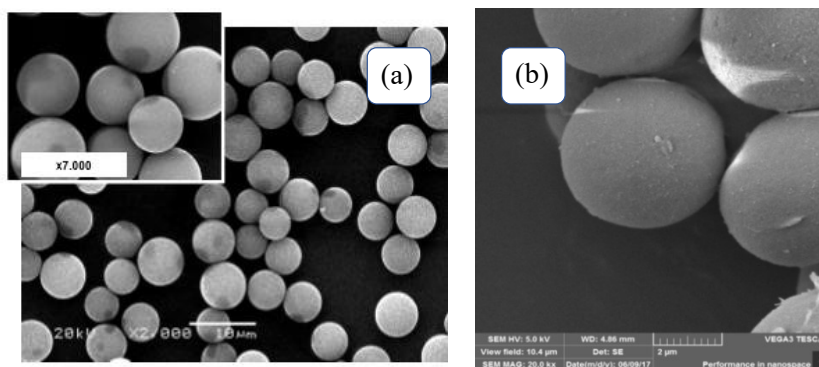
4.3 Caracterização físico-química da fase Si(DoDC)

As propriedades físico-químicas e morfológicas da nova fase estacionária Si(DoDC) foram determinadas a partir de diferentes técnicas de caracterização. Essas informações permitem avaliar a aplicabilidade do material como meio de separação cromatográfico para cromatografia líquida de alta eficiência.

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas do suporte de sílica foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, antes e após o processo de imobilização térmica do DoDC. A Figura 16 apresenta as micrografias eletrônicas destes materiais.

Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura de (a) partículas de sílica e (b) da fase estacionária Si(DoDC) imobilizada termicamente.



Fonte: próprio autor.

O estudo morfológico da fase Si(DoDC) nos permite avaliar a regularidade das suas partículas, quanto à forma e tamanho, bem como avaliar o grau de aglomeração das partículas após o processo de imobilização polimérica do DoDC.

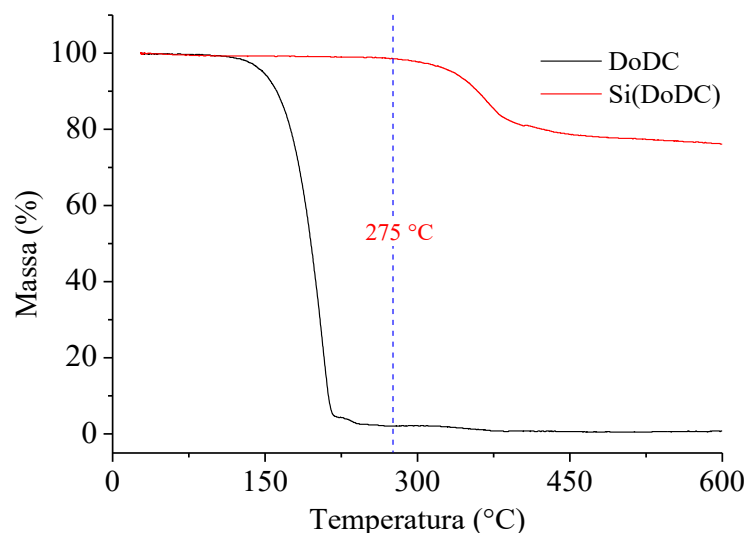
Comparando a micrografias da sílica nua (Figura 16a) e da fase estacionária Si(DoDC) (Figura 16b), verifica-se que o procedimento de imobilização polimérica não afetou a estrutura morfológica esférica do suporte de sílica de maneira significativa, apresentando boa regularidade das partículas após o processo de preparação das fases. A

camada polimérica de DoDC depositada sobre as partículas de sílica não ocasionou a formação de aglomerados de partículas, que poderiam tornar inadequada a fase para o enchimento das colunas de aço inox. Quanto mais uniforme a distribuição do material de recheio e a regularidade das partículas, melhor a compactação das partículas na coluna cromatográfica e, conseqüentemente, maior a eficiência de separação. Pelas micrografias da Figura 16 as etapas de lavagem da fase Si(DoDC) no processo de preparo foram eficientes na remoção de material orgânico residual, pois não há resíduos de reagentes ou registro de aglomerados das partículas da fase nas micrografias.

4.3.2 Análise termogravimétrica

Como a fase Si(DoDC) é obtida a partir da imobilização térmica do DoDC sobre sílica, é importante acompanhar a sua estabilidade térmica para evitar sua degradação durante a preparação. Mesmo com a estabilidade elevada do DoDC, a presença da sílica pode afetar positiva ou negativamente a estabilidade do DoDC durante a imobilização. Assim, a estabilidade térmica da fase Si(DoDC) foi avaliada por análise termogravimétrica e o perfil obtido é comparado ao perfil da curva TG do DoDC, Figura 17.

Figura 17. Curvas termogravimétricas para uma fase Si(DoDC) e para o DoDC.



Fonte: próprio autor.

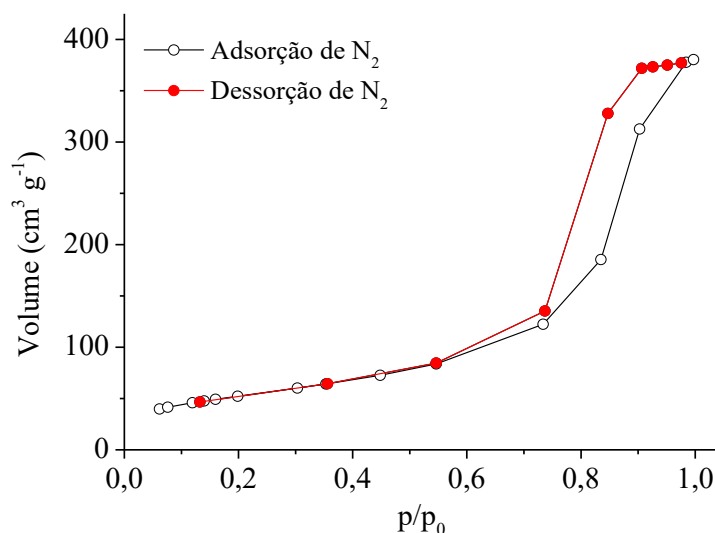
Analisando as curvas termogravimétricas apresentadas na Figura 17, observam-se pequena variação de massa até cerca de 275 °C para a fase Si(DoDC), indicando uma mínima quantidade de água adsorvida e/ou resíduos de solventes provenientes da

preparação na fase. A pequena quantidade de água adsorvida pode estar relacionada ao recobrimento adequado da superfície da sílica (altamente higroscópica) com o polímero DoDC. A partir de 275 °C observa-se uma perda de massa de 20 % até 450 °C. Este evento está provavelmente associado à decomposição do polímero DoDC imobilizado no suporte. Nenhum evento de perda de massa diretamente associado ao suporte cromatográfico foi registrado na TG, confirmando o bom recobrimento com a camada de DoDC. Comparando com a Curva TG do DoDC, observa-se que a estabilidade do DoDC na fase (quando imobilizado na sílica) apresentou uma maior estabilidade térmica do que o polímero puro.

4.3.3 Área Superficial e Análise de Porosidade

Elevadas áreas superficiais e sistemas de poros adequados, para transferências de massas rápidas dos solutos, são especialmente requeridos para os materiais de separação cromatográfica a fim de obter separações eficientes. A fase Si(DoDC) foi submetida a caracterização morfológica quanto à porosidade e área superficial específica a partir do estudo de isotermas de adsorção de nitrogênio. A curva de adsorção/dessorção de nitrogênio na fase Si(DoDC) está apresentada na Figura 18.

Figura 18. Isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio na fase Si(DoDC).



Fonte: próprio autor.

A fase Si(DoDC) apresenta, de acordo com a Figura 18 e pela definição da IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), uma isoterma do tipo IV com histerese do tipo H1. Este perfil de isoterma é característica de materiais com

mesoporos, cujos poros apresentam diâmetros no intervalo de 2 a 50 nm. O aumento do volume de gás adsorvido para pequenos valores de P/P_0 na Figura 18 indica que existe a presença de microporos associados aos mesoporos. A quantidade desses microporos, no entanto, deve ser muito pequena comparada a quantidade de mesoporos. Essas características são desejáveis na cromatografia líquida de alta eficiência, pois permitem separações mais eficientes devido à maior extensão de sítios de interação da fase estacionária com os compostos a serem separados.

A histerese do tipo H1 desenvolvida na adsorção de N_2 na fase Si(DoDC) ocorre devido às pressões de saturação não serem iguais para a condensação e a evaporação no interior dos poros, indicando uma diferença entre os perfis de adsorção e dessorção do N_2 na fase Si(DoDC), Figura 18. Este tipo de histerese indica que o material apresenta poros regulares, de formato cilíndrico e/ou poliédrico com as extremidades abertas. Este tipo de histerese está presente nas partículas de sílica, o que implica que a imobilização térmica do DoDC sobre a superfície da sílica não altera as propriedades de poros do suporte. Estes resultados podem ser confirmados pelos valores de diâmetro e volume de poros e área superficial específica apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades morfológicas do suporte cromatográfico antes e após a imobilização térmica do DoDC.

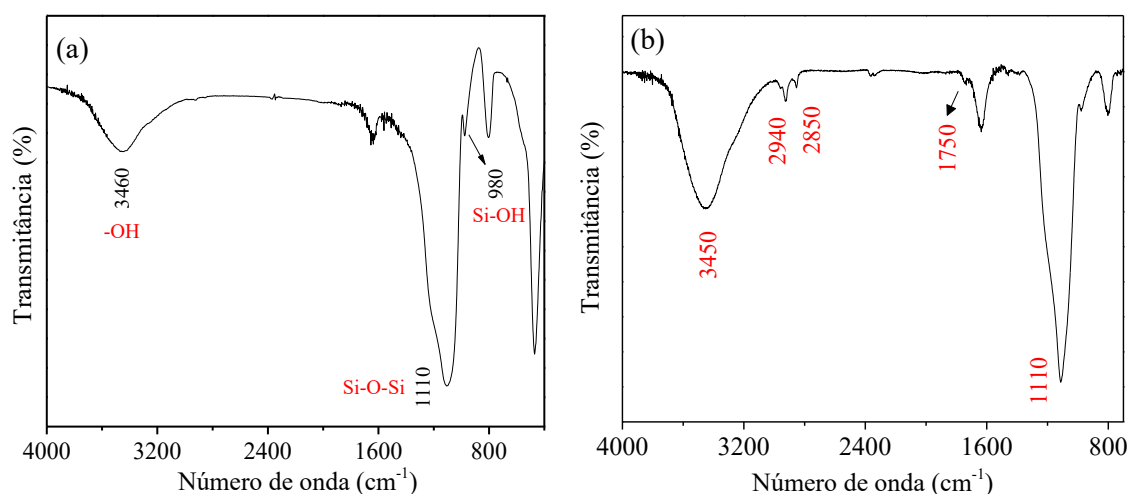
Material	Área superficial específica	Volume de poros	Diâmetro médio de poros	% C
	(m ² g ⁻¹)	(cm ³ g ⁻¹)	(nm)	
SiO ₂	309	0,85	12,1	< 0.01
Si(DoDC)	187	0,58	10,0	

A área superficial específica do suporte de sílica é reduzida em torno de 40 % com a imobilização do DoDC na preparação da fase Si(DoDC). Como ocorre uma redução do volume e diâmetro dos poros da sílica após o processo de imobilização, é possível inferir que o DoDC se deposita em toda a extensão da partícula de sílica, inclusive em seus poros. A redução no volume e no diâmetro do poro da fase Si(DoDC) está associada ao preenchimento parcial dos poros com uma fina camada de DoDC, mas sem que ocorra a obstrução total dos poros. As características morfológicas finais da fase Si(DoDC) ainda são adequadas para finalidades cromatográficas, possibilitando uma alta capacidade de interação com os compostos durante a separação.

4.3.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho da fase Si(DoDC)

A confirmação da incorporação do polímero DoDC no suporte cromatográfico de sílica foi realizada pela espectroscopia de absorção no infravermelho da fase Si(DoDC). A Figura 19 apresenta os espectros de infravermelho para a sílica nua e para a fase Si(DoDC).

Figura 19. Espectros FTIR da (a) sílica nua e da (b) fase estacionária Si(DoDC).



Fonte: próprio autor.

Nos espectros de absorção na região do infravermelho da fase Si(DoDC) e da sílica, apresentados na Figura 19, observa-se a imobilização do polímero DoDC sobre as partículas de sílica via tratamento térmico. O estiramento em 1750 cm^{-1} no espectro da fase Si(DoDC), atribuído a C=O de grupos carbonila, são provenientes do dodecanoato de celulose (DoDC), uma vez que a sílica nua não possui carbonila. Os picos em 2850 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} no espectro IV da fase Si(DoDC), são atribuídos a estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H em grupos CH_2 e CH_3 respectivamente, provenientes do recobrimento polimérico e são compatíveis com o DoDC. No espectro IV da fase Si(DoDC), em 1644 cm^{-1} , tem-se uma banda de deformação angular de moléculas de água que, possivelmente estão adsorvidas na superfície da sílica. Percebe-se pela largura e intensidade, que tal banda possui uma contribuição, da banda de carbonila em 1750 cm^{-1} do DoDC imobilizado na sílica.

4.4 Caracterização Cromatográfica das fases Si(DoDC)

As fases estacionárias Si(DoDC) preparadas foram avaliadas cromatograficamente a partir da análise de misturas teste padrão, que determinam as propriedades de retenção de compostos de diferentes características no revestimento polimérico. Através da separação destas misturas pode-se avaliar as características de retenção da fase estacionária, o mecanismo de separação e a aplicabilidade do material. Inicialmente foi analisada uma mistura, denominada hidrofóbica, para determinar o mecanismo da separação na fase Si(DoDC) e otimizar as condições de fase móvel para as separações.

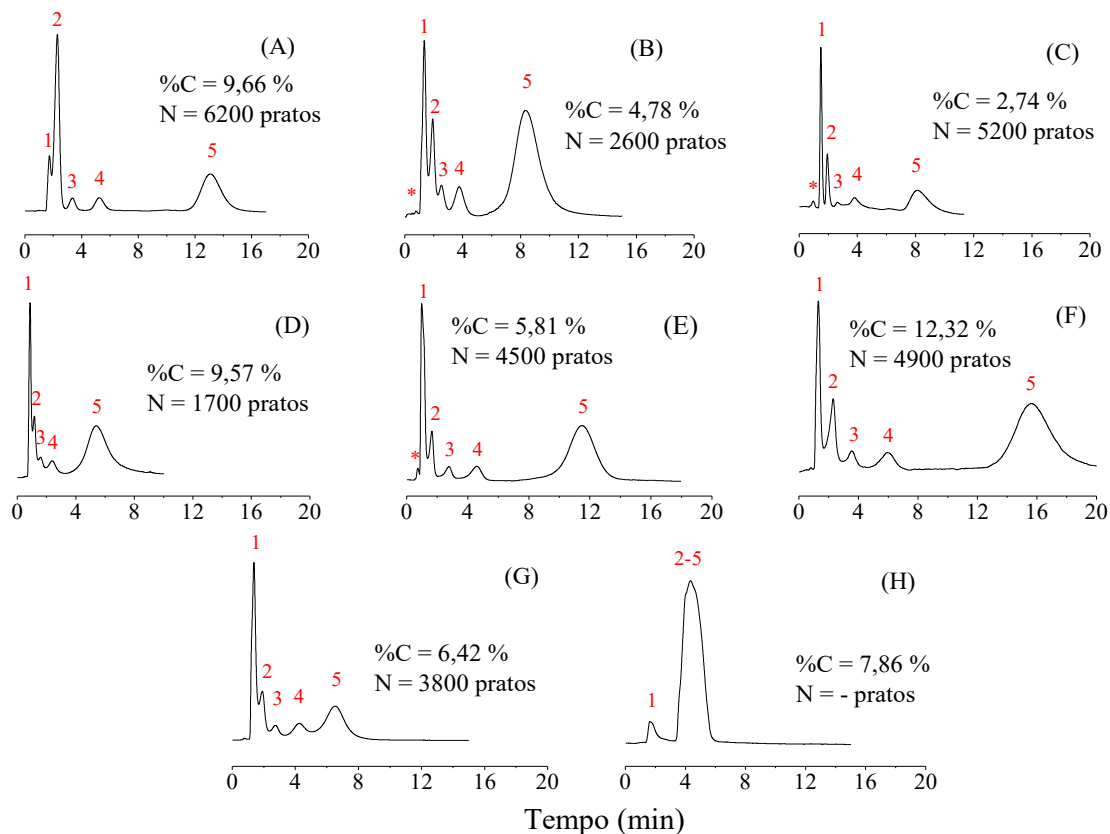
4.4.1 Mistura teste hidrofóbica

A mistura hidrofóbica composta de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno é empregada na avaliação da fase estacionária quanto ao modo de separação, indicada pela ordem de eluição das substâncias. Esta mistura é preparada pelo grupo de pesquisa e utilizada para avaliação de todos os materiais produzidos no grupo.

A melhor proporção de fase móvel para a separação da mistura teste hidrofóbica nas fases Si(DoDC) foi determinada a partir da avaliação de diferentes proporções de metanol:água (MeOH:H₂O), composição típica do modo de fase reversa da CLAE. A composição MeOH:H₂O (50:50, v/v) foi a que propiciou a separação e resolução mais adequada dos compostos.

Os cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(DoDC) preparadas de acordo com o planejamento experimental estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pelas fases Si(DoDC) preparadas de acordo com o planejamento experimental. (A) fase #1, (B) fase #2, (C) fase #3, (D) fase #4, (E) fase #5, (F) fase #6, (G) fase #7 e (H) fase #8. Condições de análise: fase móvel: MeOH H₂O (50:50, v/v), vazão de 0,5 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno e (*) impureza.



Fonte: próprio autor.

A partir da Figura 20 observa-se que as fases estacionárias preparadas, exceto para o cromatograma da Figura 20H, foram capazes de separar a mistura teste hidrofóbica, indicando um mecanismo de separação baseado em interações hidrofóbicas, na qual os compostos mais apolares ficam retidos mais tempo que os compostos menos apolares. Essa característica era esperada, uma vez que a celulose modificada, com 12 átomos de carbono e com um GS de 1,7, se torna uma camada hidrofóbica como recobrimento da superfície da sílica. Essa ordem de eluição é característica do modo de fase reversa, logo, as fases Si(DoDC) atuam como fases estacionárias reversas.

As fases com maior quantidade de carbono, #1 e #6, representadas nos cromatogramas (Figura 20A e 20F, respectivamente), separaram de forma mais adequada e eficiente a mistura hidrofóbica, porém, observa-se que as fases com menores porcentagens

de carbono, como a fase #3 (Figura 20C), também apresentaram boa separação dos compostos.

Espera-se que fases com maior teor de carbono separem mais eficientemente os compostos hidrofóbicos, por que em teoria recobririam melhor a superfície do suporte cromatográfico e melhoraria o desempenho. Porém, os resultados acima apresentados nos mostram que muitas vezes uma quantidade grande de carbono não necessariamente propicia uma melhor separação, muitas vezes ocorre bloqueio dos poros do suporte cromatográfico, fazendo com que o transporte de massa dos analitos seja lento, diminuindo consequentemente, o desempenho cromatográfico da fase.

Os parâmetros cromatográficos obtidos da separação dos compostos da mistura hidrofóbica estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos de desempenho das fases Si(DoDC) preparadas em diferentes condições, de acordo com o planejamento experimental.

Fases Si(DoDC)	k ^a	A _{s 10 %} ^a	R _s ^b	N/m ^a
#1	8,00	1,4	3,68	6.200
#2	4,77	1,3	2,33	2.600
#3	4,60	1,6	3,04	5.200
#4	2,71	1,5	1,99	1.700
#5	6,93	0,9	3,21	4.500
#6	9,79	1,3	3,43	4.900
#7	6,15	1,6	3,04	3.800
#8	-	-	-	-

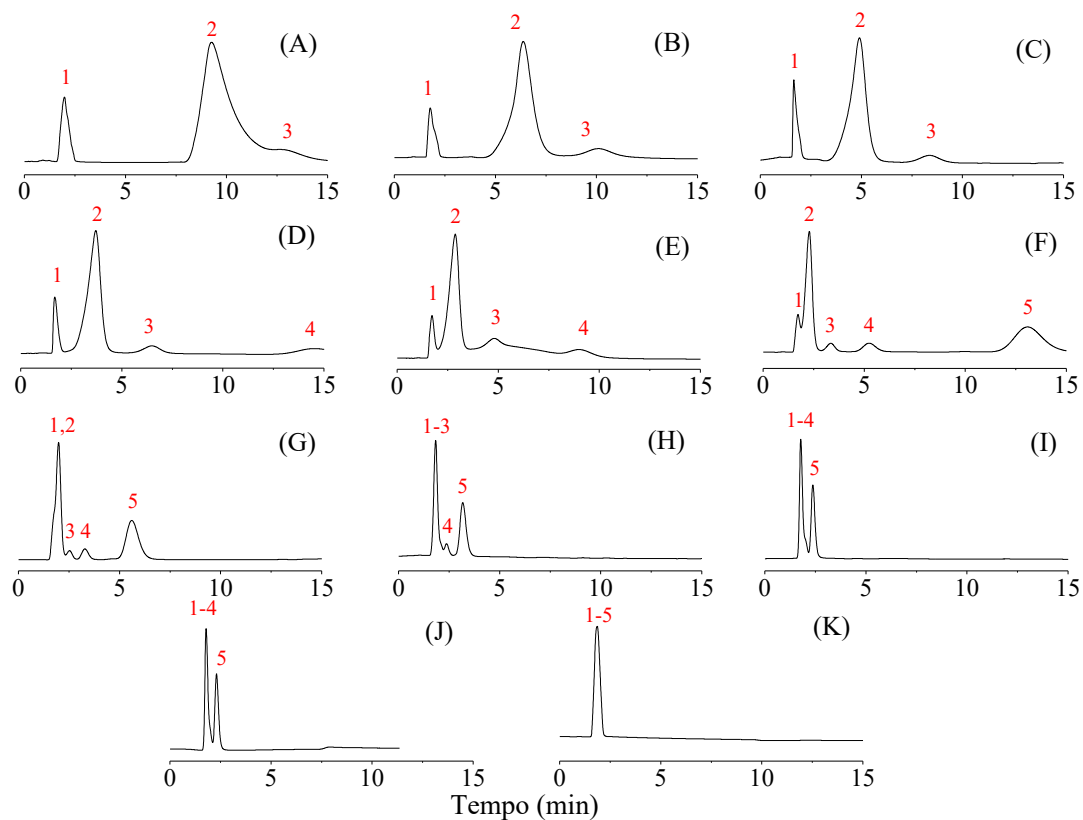
^a medido para o pico do naftaleno; ^b medido para o par tolueno-naftaleno.

De uma forma geral, observa-se que as fases Si(DoDC) não apresentaram um bom desempenho cromatográfico, uma vez que o número de pratos (N/m), que mede a eficiência da separação (capacidade de eluir os compostos sem o alargamento dos picos), ficou abaixo dos valores encontrados para fases baseadas no recobrimento polimérico com polissiloxanos por exemplo, normalmente acima de 40.000 pratos/m (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009). Este fato pode estar associado às características do derivado celulósico com relação ao transporte de massas quando comparado a outros polímeros que se comportam como solvente em condições de uso da CLAE. No entanto, a capacidade de

separação da fase Si(DoDC) é demonstrada nos cromatogramas da Figura 20 e na Tabela 6, em que os picos são bem resolvidos e com parâmetros cromatográficos adequados. Os valores de fator de retenção (k) para o pico mais retido nas fases Si(DoDC), o naftaleno, estão de acordo com a porcentagem de carbono nas fases, ou seja, aumentam com o aumento da quantidade de DoDC imobilizado na sílica. Em todas as fases Si(DoDC), exceto para a obtida no experimento 8 (Figura 20H) que não apresentou condições adequadas de separação, foram obtidos picos com fator de assimetria $As_{10\%}$ (medido para o pico do naftaleno) entre 0,9 e 1,6 e resolução entre picos (R_s , medida para os picos de naftaleno e tolueno) maior que 1,25 (mínimo para separação entre dois compostos), indicando potencialidade do material ser empregado como fase estacionária para CLAE-FR. Dentre as fases Si(DoDC) avaliadas, a fase #1 apresentou a melhor e mais eficiente separação dos compostos da mistura teste hidrofóbica. A fase Si(DoDC) #1 foi empregada na separação da mistura hidrofóbica para avaliação da melhor composição de solventes para a fase móvel MeOH:H₂O. Na Figura 21 estão apresentados os cromatogramas obtidos dessas medidas.

Através dos cromatogramas da Figura 21, observa-se que a melhor condição de proporção dos solventes MeOH e H₂O na fase móvel, que resulta na separação de todos os compostos com boa resolução dentro de um tempo mais curto de análise, foi de 50:50 (v/v). O composto 1 nos cromatogramas, a uracila, é utilizada apenas como marcador da fase móvel, ou seja, a sua presença registra o tempo necessário para que a fase móvel (que não gera pico no cromatograma) atravessasse o percurso cromatográfico. Assim, a co-eluição da uracila com a benzonitrila (pico 2) na proporção MeOH:H₂O 50:50 (v/v) indica apenas a baixa retenção da benzonitrila na fase Si(DoDC), devido à sua polaridade maior se comparada aos outros compostos da mistura, que resulta em menor interação com a cadeia de 12 carbonos do DoDC.

Figura 21. Cromatogramas da separação da mistura hidrofóbica pela fase Si(DoDC) #1. Condições de análise: fase móvel: MeOH:H₂O (A) 0:100, v/v, (B) 10:90, v/v, (C) 20:80, v/v, (D) 30:70, v/v, (E) 40:60, v/v, (F) 50:50, v/v, (G) 60:40, v/v, (H) 70:30, v/v, (I) 80:20, v/v, (J) 90:10, v/v, (K) 100:0, v/v. Vazão de 0,5 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação dos compostos: (1) Uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno e () impurezas.*

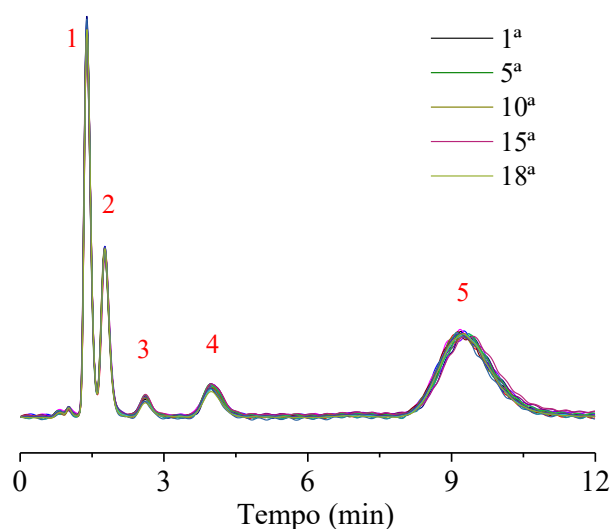


Fonte: próprio autor.

4.4.2 Estudo da repetibilidade do tempo de retenção dos compostos na fase Si(DoDC)

A fixação do DoDC na superfície da sílica foi avaliada pela análise sequencial da mistura teste hidrofóbica pela fase Si(DoDC), monitorando o tempo de retenção e a área de pico do naftaleno ao longo de 18 corridas cromatográficas. Os cromatogramas obtidos após 18 separações consecutivas da mistura teste hidrofóbica estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Separação sucessiva da mistura teste hidrofóbica pela fase Si(DoDC) #1. Condições: fase móvel MeOH:H₂O (60:40, v/v), vazão de 0.5 mL min⁻¹, detecção UV a 254 nm, temperatura de 25 °C.



Fonte: próprio autor.

Os cromatogramas obtidos a partir da separação sucessiva da mistura teste hidrofóbica pela fase Si(DoDC), após 18 injeções, mostradas na Figura 25, indicam que não houve perda significativa da camada polimérica de DoDC da fase estacionária durante as análises. A variação do tempo de retenção para o naftaleno após as análises foi de apenas 0,20 % em termos de desvio padrão relativo, enquanto que a área do pico do naftaleno apresentou um desvio padrão relativo menor que 0,05 %. Esse resultado indica que o DoDC se apresenta fixo na superfície do suporte de sílica e, mesmo com elevada pressão e passagem de solventes da fase móvel, sua estabilidade não é afetada, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa pela fase Si(DoDC) de forma confiável (GRITTI *et al.*, 2010).

4.4.3 Protocolo teste de Tanaka

A segunda mistura analisada, na verdade, um conjunto de quatro misturas testes de compostos padrão, denominado de protocolo de Tanaka foi desenvolvido por Tanaka e colaboradores. Trata-se de um protocolo muito empregado por diversos grupos de pesquisa acadêmicos e fabricantes de colunas cromatográficas para CLAE para avaliar a qualidade de suas fases estacionárias (KIMATA *et al.*, 1989). Esse protocolo permite determinar importantes propriedades de retenção e, assim, inferir na seletividade das fases

estacionárias em desenvolvimento. Além disso, existem atualmente mais de 1000 fases estacionárias analisadas por esta mistura, possibilitando uma comparação das características da fase preparada com as já desenvolvidas.

As propriedades de retenção das fases Si(DoDC) desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas pelo protocolo de Tanaka. Os parâmetros cromatográficos, retirados dos cromatogramas de separação das misturas de Tanaka, estão apresentados na Tabela 7.

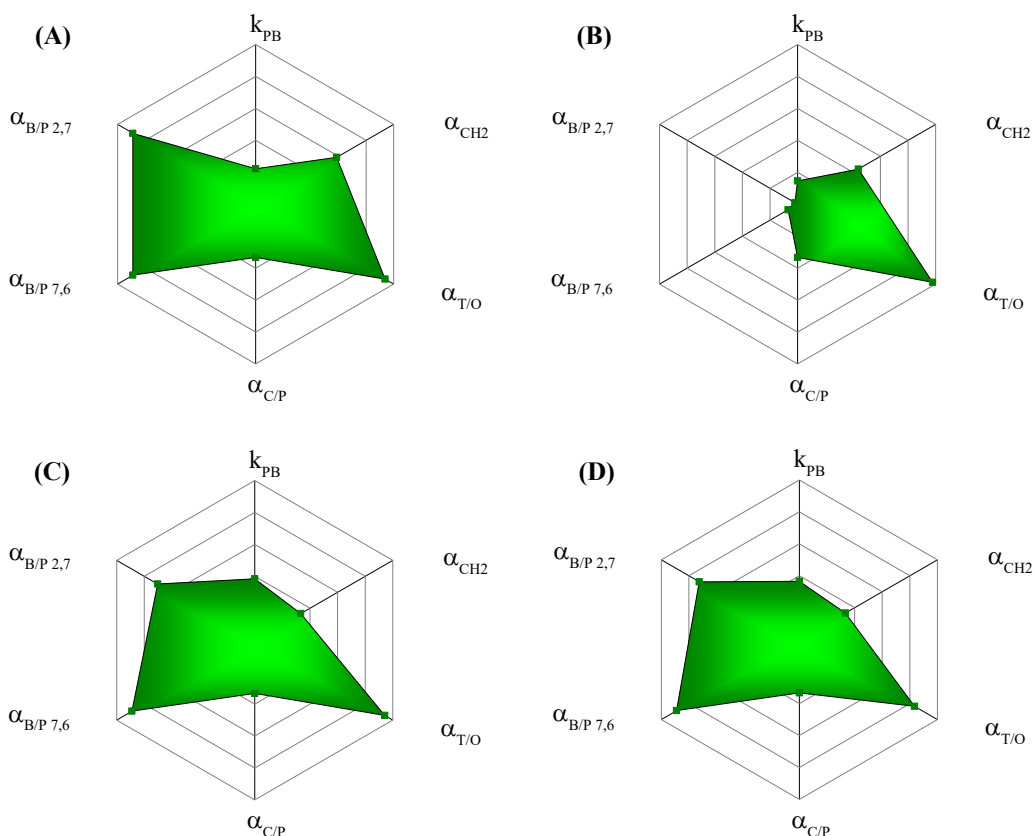
Tabela 7. Parâmetros de seletividade das fases Si(DoDC) obtidas pelo protocolo de Tanaka.

Parâmetros	Fases Si(DoDC)							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
k_{PB}	1,11	0,73	1,00	1,00	1,92	1,83	1,00	1,00
α_{CH_2}	1,76	1,32	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{T/O}$	6,56	6,84	1,00	1,00	6,59	5,84	1,00	1,00
$\alpha_{C/P}$	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{B/P}$ pH 7,6	1,00	8,38	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\alpha_{B/P}$ pH 2,7	1,00	8,82	1,00	1,00	2,67	2,48	3,86	1,00

De acordo com os resultados da Tabela 7, algumas fases Si(DoDC) não apresentaram capacidade de separação das substâncias (parâmetros de seletividade igual a 1) nas diferentes misturas. Essas fases, portanto, não se apresentaram adequadas para a finalidade de obtenção de um material de separação capaz de separar misturas que possuem dificuldades de serem separadas nas colunas comerciais disponíveis. As demais fases Si(DoDC) (#1, #2, #5 e #6) apresentaram como principal característica um alto valor de $\alpha_{T/O}$, seletividade estérica. Os valores de $\alpha_{T/O}$ obtidos, acima de 5, são superiores aos obtidos por fases reversas convencionais disponíveis comercialmente (CRUZ *et al.*, 1997). Por exemplo, a coluna comercial Discovery C₁₈, da marca Supelco, possui $\alpha_{T/O}$ de 1,51 enquanto a coluna comercial Resolve C₁₈ da Waters apresenta $\alpha_{T/O}$ de 1,59 (EUEBY; PETERSSON, 2003). Essa característica pode estar associada à celulose, devido à sua quiralidade, que transfere para o recobrimento da fase estacionária a capacidade de separar substâncias de características de polaridade similares, porém com disposição no espaço distinta, como no caso da separação do o-terfenilo e do trifenileno. Para uma visão mais geral das propriedades de retenção das fases Si(DoDC) os dados da Tabela 7 foram plotados em gráficos do tipo radar, Figura 23, em que cada um dos eixos do gráfico

corresponde a uma propriedade de retenção da fase Si(DoDC) obtida pela separação das misturas de Tanaka.

Figura 23. Parâmetros de retenção obtidos pelo protocolo de Tanaka para as fases estacionárias Si(DoDC). (A) Fase #1, (B) Fase #2, (C) Fase #5 e (D) Fase #6.



Fonte: próprio autor.

O gráfico do tipo radar, Figura 23, permite realizar uma avaliação geral das propriedades de retenção das fases estacionárias, possibilitando avaliar a melhor fase dentre aquelas preparadas. Nessa condição, a fase #1 apresentou o melhor resultado global em termos de retenção pela separação das misturas testes do protocolo de Tanaka. Esse resultado global significa uma maior retenção para os compostos na camada polimérica e consequentemente uma menor retenção residual no suporte de sílica, ou seja, um melhor recobrimento do suporte pela camada de DoDC. Esse melhor recobrimento, como pode ser observado pelas porcentagens de carbono em cada fase estacionária, não está relacionado com a quantidade de polímero imobilizado, mas sim com a qualidade do recobrimento devido ao melhor rearranjo do polímero sobre a superfície do suporte.

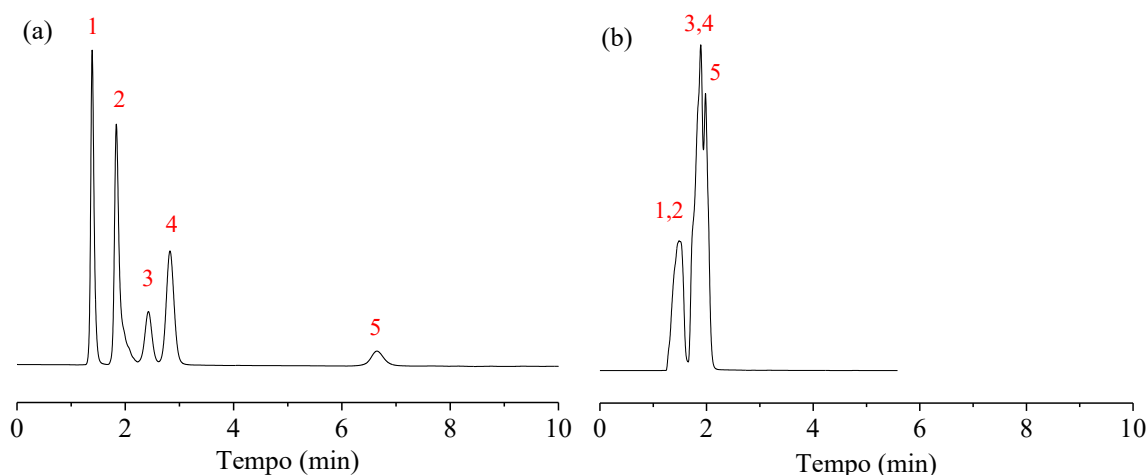
4.5 Potencialidade de aplicações da fase Si(DoDC)

As fases estacionárias Si(DoDC) foram avaliadas quanto a sua potencialidade em separar substâncias altamente polares como os fármacos: hidroclorotiazida, furosemida, cimetidina, famotidina e ranitidina, que apresentam pKa normalmente acima de 9. Além disso, as fases Si(DoDC) também foram avaliadas quanto a sua capacidade em separar uma mistura de uma série homóloga de isômeros de posição do surfactante aniônico sulfonato de alquilbenzenos lineares (LAS, do inglês *linear alkylbenzene sulphonate*) e uma mistura racêmica de isômeros do fármaco omeprazol. Essas duas misturas foram avaliadas devido às características de seletividade estérica indicadas pela Mistura de Tanaka.

4.5.1 Separação de uma mistura de fármacos

A mistura de fármacos selecionada (hidroclorotiazida, furosemida, cimetidina, famotidina e ranitidina) para a avaliação da fase Si(DoDC) é constituída de compostos com pKa maiores que 9, ou seja, compostos que apresentam cargas positivas nas condições normais de análise por CLAE-FR, que apresentam baixa retenção na fase estacionária e, portanto, dificuldade de separação. A Figura 24 apresenta os cromatogramas da separação dos fármacos pela fase Si(DoDC) e por uma fase C₁₈ quimicamente ligada.

Figura 24. Cromatogramas da separação dos fármacos (1) furosemida, (2) hidroclorotiazida, (3) famotidina, (4) cimetidina e (5) ranitidina pelas fases (a) Si(DoDC) e (b) C₁₈. Condições: ACN:Sol. CH₃COONH₄ 0,02 mol L⁻¹ (40:60, v/v); 1,0 mL min⁻¹; 30 °C, detecção UV 224 nm.



Fonte: próprio autor.

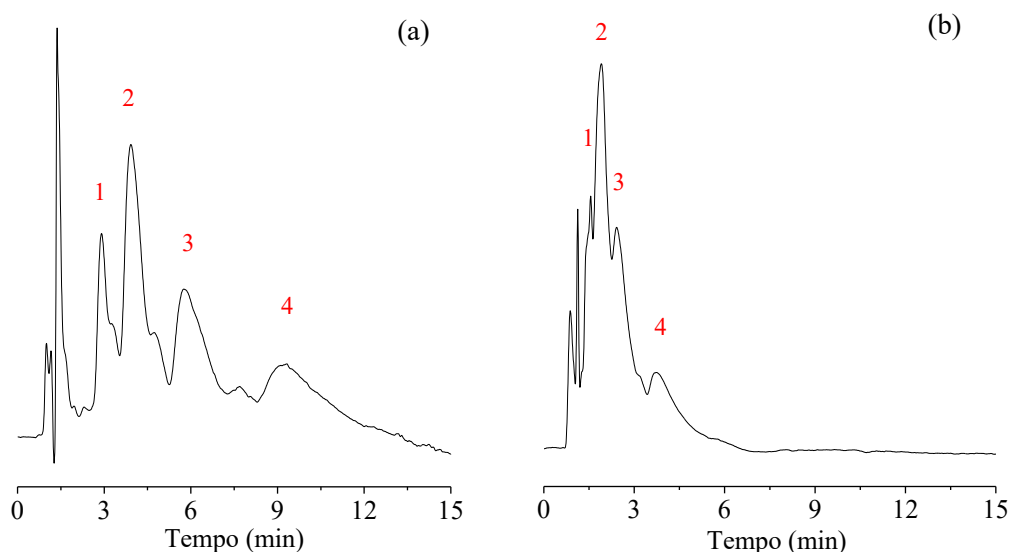
Observam-se nos cromatogramas de separação da mistura de fármacos na Figura 24 que apenas a coluna recheada com a fase Si(DoDC) foi capaz de separar os cinco compostos de forma eficiente. A separação ocorreu em um tempo relativamente curto, cerca de 7 min, empregando uma eluição isocrática. O uso de acetato de amônio na fase móvel foi para garantir a eluição dos compostos na forma neutra, em que o grupo acetato neutraliza as cargas positivas dos fármacos nas condições de análise. Desta forma, os compostos apresentaram adequada retenção na fase Si(DoDC), enquanto que na fase C₁₈ comercial, pouca retenção foi obtida coelunando os cinco compostos quase totalmente.

4.5.2 Separação dos isômeros do surfactante LAS

A possibilidade de contribuição de características da celulose para a fase estacionária foi avaliada na separação de isômeros de posição do surfactante LAS. O LAS é constituído de uma mistura de isômeros de posição com cadeias alquiladas lineares, variando de C₁₀ a C₁₆, com predominância de C₁₀ a C₁₃ (PENTEADO; SEOUD; CARVALHO, 2006). Para este estudo foram utilizadas colunas cromatográficas recheadas com a fase Si(DoDC) #1 e com uma fase C₁₈ comercial, para finalidades de comparação. Os cromatogramas de separação são apresentados na Figura 25.

Figura 25. Cromatograma da separação do LAS nas fases (a) Si(DoDC)#1 e (b) C₁₈ comercial.

Condições: fase móvel ACN:sol. NH₄Ac 0,02 mol L⁻¹ (40:60, v/v), vazão de 0,5 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, detecção UV a 254 nm. Identificação: 1: C₁₀, 2: C₁₁, 3: C₁₂ e 4: C₁₃.



Fonte: próprio autor.

A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 25, observam-se que a fase Si(DoDC) preparada em laboratório apresentou melhor separação dos compostos isoméricos presentes no LAS. Cada um dos picos apresentados corresponde a um componente do LAS de C₁₀ a C₁₃, em que a ordem dos compostos foi definida de acordo com o mecanismo de separação definido para as fases reversas, uma vez que não houveram injeções individuais dos padrões. O LAS é um dos compostos (misturas) de difícil análise em fases comerciais convencionais, devido à complexidade da mistura isomérica. Este fato pode ser confirmado pela separação ineficiente observada para a fase C₁₈ comercial apresentada na Figura 25b. A capacidade de separação do LAS pela fase Si(DoDC) pode ser atribuída à seletividade da camada de DoDC para a mistura de compostos.

O acetato de amônio na fase móvel foi utilizado para neutralizar as cargas dos isômeros do LAS, que são tensoativo aniônicos, impedindo interações eletrostáticas com as fases estacionárias.

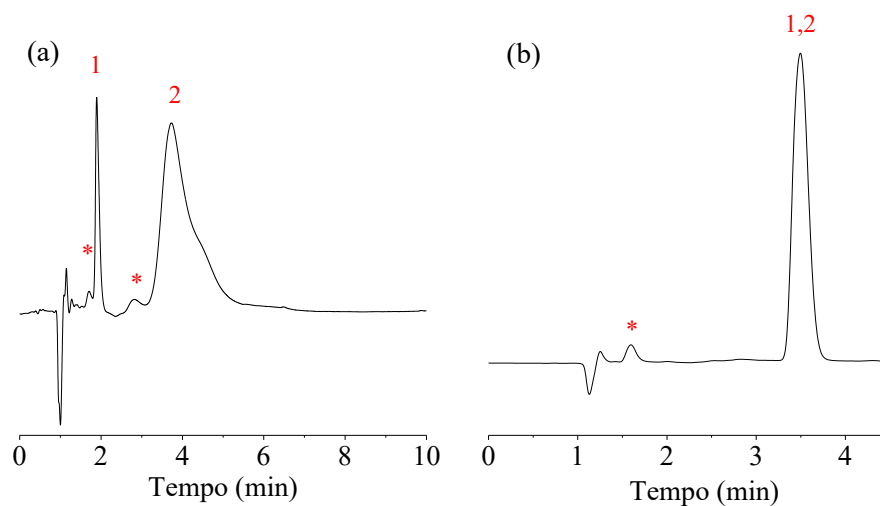
4.5.3 Separação de isômeros espaciais (enantiômeros) do omeprazol

A capacidade de separação de compostos opticamente ativos pela fase Si(DoDC) foi avaliada pela análise de uma mistura racêmica do omeprazol. A mistura foi também aplicada em uma coluna recheada com uma fase comercial C₁₈ para confirmação da dificuldade de separação de compostos dessa natureza em materiais convencionais. A Figura 26 apresenta os cromatogramas da separação dos isômeros R,S do omeprazol.

De acordo com a Figura 26 pode-se observar que a mistura R,S do omeprazol é bem resolvida pela fase Si(DoDC) e o mesmo não ocorre na fase C₁₈ comercial, como esperado. A confirmação dos picos dos isômeros do omeprazol foi realizada pela injeção individual dos compostos nas duas fases avaliadas. Este resultado de separação de enantiômeros pela fase Si(DoDC) deve estar relacionado à contribuição da celulose às características de separação do material final, uma vez que a celulose apresenta como uma das suas características principais a quiralidade. É importante mencionar que a preparação da fase, sem a utilização de processo químico de fixação do derivado celulósico sobre a sílica, também possui uma contribuição fundamental para que características da celulose fossem mantidas no material final. Observa-se na literatura (SHEN; TOMOYUKI; OKAMOTO, 2014; GALLINELLA *et al.*, 2014; KHARAISHVILI *et al.*, 2016) que a

ligação química de derivados celulósicos normalmente desativa algumas características da celulose, como sua potencialidade de aplicação na separação quiral.

Figura 26. Cromatograma da separação dos isômeros (1) (R)-Omeprazol e (2) (S)-Omeprazol pelas (a) fase Si(DoDC) e (b) pela fase C₁₈ comercial. Condições: fase móvel MeOH:H₂O (60:40, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, detecção UV a 224 nm.



Fonte: próprio autor.

5 CONCLUSÃO

As fases estacionárias obtidas pela imobilização térmica do polímero dodecanoato de celulose sobre o suporte de sílica, Si(DoDC), mostraram potencialidade para serem utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).

O uso da celulose modificada como recobrimento polimérico para fases estacionárias se torna uma alternativa interessante, desde o ponto de vista econômico até de seletividade, para preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida. A facilidade de modificação da superfície da celulose e a possibilidade de imobilização térmica do derivado na superfície de suporte cromatográfico, como observado pelos resultados, abre um campo de estudos desses materiais como meio de separação cromatográfica. As características da celulose e do agente modificador se combinam para dar uma seletividade intrínseca à fase estacionária. Como visto nas fases Si(DoDC) preparadas neste trabalho, a quiralidade da celulose e a hidrofobicidade da cadeia de 12 carbonos do dodecanoato resultaram em uma fase que atua na modalidade de cromatografia líquida de fase reversa com alta seletividade para separação de compostos isoméricos e compostos altamente polares. Foi possível determinar uma condição mais adequada de preparação da fase estacionária que resultasse em melhor recobrimento polimérico do suporte cromatográfico com boas propriedades de retenção cromatográfica para os compostos. As caracterizações físico-químicas e morfológicas da fase Si(DoDC) indicaram a imobilização eficiente do dodecanoato de celulose sobre a sílica, mantendo no material final as características adequadas para fins cromatográficos. A expectativa é que seja viável o uso de celulose regenerada da biomassa para que possa ser modificada e empregada como recobrimento polimérico de fases estacionárias para CLAE, pois permitiria uma preparação de material de mais baixo custo, de disponibilidade imediata e de seletividade ajustada a um determinado problema analítico.

Como o objetivo da preparação da fase Si(DoDC) visava a separação de compostos hidrofóbicos de cadeias mais longas difíceis de serem analisados por CLAE, avaliou-se a aplicabilidade de fase estacionária na separação de isômeros do tensoativo LAS, obtendo melhor separação dos seus isômeros em um tempo relativamente curto, quando comparado com uma fase C₁₈ comercial. A aplicação da fase Si(DoDC) na separação dos isômeros mostrou que a fase tem seletividade adequada para resolver misturas enantioméricas, como o (R,S)-omeprazol.

Pela simplicidade na preparação, pelo acesso fácil à matéria-prima e pela grande capacidade de separar misturas de compostos altamente polares e isoméricas, as fases estacionárias baseadas em derivados celulósicos imobilizados termicamente sobre suporte de sílica, mostram viabilidade e inúmeras possibilidades de aplicação no ramo farmacêutico, agroindustrial e em outros diversos setores da indústria química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, I.A.; RAGAB, Y.A. Esterification of Shambat Cotton Cellulose by (octanoyl (C8), decanoyl (C10) and lauroyl (C12) acid chlorides using N,N-Dimethyl Acetamide/Lithium Chloride Solvent System. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, V. 1(6), P. 101-112, **2014**.

ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr. A*, v. 499, p. 177-196, **1990**.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3)

ANAZAWA, T.A. Imobilização por radiação gama de fase estacionária líquida sobre suporte de sílica para uso em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dissertação de mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, **1992**.

BEGNINI, F.R. Preparação e caracterização de fase estacionária reversa fenil-propil-metil-siloxano, imobilizada por micro-ondas, para cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, **2011**.

BOTTOLI, C.B.G.; CHAUDHRY, Z.F.; FONSECA, D.A.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 948, p. 121-128, **2002**.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01316-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01316-4)

BOTTOLI, C.B.G.; CHAUDHRY, Z.F.; FONSECA, D.A.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 948, p. 121-128, **2002**.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01316-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01316-4)

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. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, UFU, Uberlândia, **2017**.

CARVALHO, G.O.; COLLINS, C.H.; FARIA, A.M. Self-Immobilization of Poly(methyltetradecylsiloxane) onto Metalized Silica Particles as Stationary Phases for HPLC. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, p. 1297-1304, **2016**.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160028>

CHEN, X.; QIN, F.; LIU, Y.; HUANG, X.; ZOU, H. Synthesis of chiral stationary phases with radical polymerization reaction of cellulose phenylcarbamate derivatives and vinylized silica gel. *J. Chromatogr. A*, v. 1034, p. 109-116, **2004**.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.007>

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia, 4ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, p. 32-42, **2006**.

CREPY, L.; MIRI, V.; JOLY, N.; MARTIN, P.; LEFEBVRE, J.M. Effect of side chain length on structure and thermomechanical properties of fully substituted cellulose fatty esters. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1812-1820, **2011**.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.045>

CRUZ, E.; EUERBY, M.R.; JOHNSON, C.M.; HACKETT, C.A. Chromatographic classification of commercially available reversed-phase HPLC columns.

Chromatographia, v. 44, p. 151-161, **1997**. <https://doi.org/10.1007/BF02466449>

DIB, S.R.; FARIA, A.M. Polyethyleneimine immobilized on silica endcapped with octadecyl groups as a stationary phase for RP-LC. *Chromatographia*, v. 77, n. 7-8, p. 533-541, **2014**. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2649-1>

DONINI, I.A.N.; SALVI, D.T.B.; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. *Ecletica Quím.*, v. 35, n. 4, p. 165 - 178, **2010**. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

ENGELHARDT, H.; CLAY, Ch.; SAAR, J. Reversed Phase Chromatography – the Mystery of Surface Silanols. *Chromatographia*, v. 62, n. 13S, p. S19-S29, **2005**. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0573-0>

ENGELHARDT, H.; JUNGHEIM, M. Comparison and characterization of reversed phases. *Chromatographia*, v. 29, p. 59-68, **1990**. <https://doi.org/10.1007/BF02261141>

EUERBY, M.R.; PETERSSON, P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 994, p. 13-36, **2003**.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00393-5)

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. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, **2006**.

FARIA, A.M.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 1385-1398, **2009**. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000800002>

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

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.032>

FARIA, A.M.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Enhanced Stability Stationary Phases Based on Poly(methyltetradecylsiloxane) Immobilized onto Doubly Titanized Silica Particles. *Chromatographia*, v. 67, p. 357-363, **2008**. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0517-6>

FARIA, A.M.; SILVA, C.R.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.R. Development of a polymer-coated stationary phase with improved chemical stability in alkaline mobile phases. *J. Sep. Sci.*, v. 31, p. 953–960, **2008**. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700607>

FIGGE, H.; DEEGE, A.; KdHLER, J.; SCHOMBURG, G. Stationary phases for reversed-phase liquid chromatography coating of silica by polymers of various polarities. *J. Chromatogr.*, v. 351, p. 393-408, **1986**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83517-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83517-2)

FREITAS, R.R.M. Estudo das propriedades dinâmico mecânicas e de biodegradação de acetatos de celulose com diferentes graus de substituição. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências dos Materiais, UFSCAR, Sorocaba, **2016**.

GALLINELLA, B.; BUCCIARELLI, L.; ZANITTI, L.; FERRETTI, R.; CIRILLI, R. Direct separation of the enantiomers of oxaliplatin on a cellulose-based chiral stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography mode. *J. Chromatogr. A*, v. 1339, p. 210-213, **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.071>

GREGG, S.J.; SING, K.S.W. Adsorption, Surface Area and Porosity, 2^a ed., London: Academic Press, **1982**. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19820861019>

GRITTI, F.; SANCHEZ, C.A.; FARKAS, C. T.; GUIOCHON, G. Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments. *J. Chromatogr. A*, v. 1217, p. 3000-3012, **2010**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.044>

GUO, Y.; WANG, X.; LI, D.; DU, H.; WANG, X.; SUN, R. Synthesis and characterization of hydrophobic long-chain fatty acylated cellulose and its self-assembled nanoparticles. *Polym. Bull.*, v. 69, p. 389–403, **2012**. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0729-7>

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, K.E.; ANAZAWA, T.A. Radiation immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silica for use in HPLC: a uniform layer model. *J. Chromatogr. A*, v. 849, p. 299-307, **1999**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00555-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00555-5)

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. *Microchem. J.*, v. 77, p. 191-198, **2004**. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2004.02.013>

JARDIM, I.C.S.F.; MALDANER, L.; LOURENÇO, J.; FIORAVANTI, L.M.A.; COLLINS, C.H. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 2917-2929, **2010**. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000313>

KHARAISHVILI, Q.; JIBUTI, G.; FARKAS, T.; CHANKVETADZE, B. Further proof to the utility of polysaccharide-based chiral selectors in combination with superficially porous silica particles as effective chiral stationary phases for separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1467, p. 163-168, **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.046>

KATAEV, A.D.; SABUROV, V.V.; REZNIKOVA, O.A.; KAPUSTIN, D.V.; ZUBOV, V.P. Polytrifluorostyrene-coated silica as a packing for column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 660, p. 131-136, **1994**. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85106-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85106-9)

KIMATA, K.; IWAGUCHI, K.; ONISHI, S.; JINNO, K.; EKSTEEN, R.; HOSOYA, K.; ARAKI, M.; TANAKA, N. Chromatographic characterization of silica-C18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 27, n. 12, p. 721-728, **1989**. <https://doi.org/10.1093/chromsci/27.12.721>

KIRKLAND, J.J. Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr. A*, v. 1060, p. 9-21, **2004**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01892-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01892-8)

- KOSAKA, P.M. Aplicações e caracterizações de ésteres de celulose. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, São Paulo, **2007**. <https://doi.org/10.11606/T.46.2008.tde-02042008-074721>
- LANÇAS, F.M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). *Scientia Chromatographica*, v. 2, p. 49-57, **2010**.
- LIND, T.; RYDBERG, L.; KYLEBÄCK, A.; JONSSON, A.; ANDERSSON, T.; HASSELGREN, G.; HOLMBERG, J.; RÖHSS, K. Esomeprazole provides improved acid control vs. omeprazole in patients with symptoms of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 14, p. 861-867, **2000**. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00813.x>
- LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, J. PETTERSEN, R. Bergman, Experimental design and optimization. *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, v. 42, p. 3-40, **1998**. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)
- MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Quim. Nova*, v. 33, p. 1559-1568, **2010**. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900574>
- MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. A new thermally immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC. *J. Sep. Sci.*, v. 33, p. 174-181, **2010**. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900574>
- MAO, Y.; FUNG, B.M. A Study of the Adsorption of Acrylic Acid and Maleic Acid from Aqueous Solutions onto Alumina. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, v. 191, p. 216-221, **1997**. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4954>
- MCCALLEY, D.V.; NEUE, U.D. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1192, p. 225-229, **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.049>
- MEYER, V.R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 5th ed. Chichester: Wiley, p. 426, **2010**. <https://doi.org/10.1002/9780470688427>
- MORAIS, L.R.S.; JARDIM, I.C.S.F. Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified sílica. *J. Chromatogr. A*, v. 1073, p. 127-135, **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.044>
- NAHUM, A.; HORVATH, C. Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases i. Dual retention mechanism in reversed-phase graphy. *J. Chromatogr.*, v. 203, p. 53-63, **1981**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80281-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80281-2)
- NAZARIO, C.E.D.; LANÇAS, F.M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. *Scientia Chromatographica*, v.5(2), p. 111-135, **2013**. <https://doi.org/10.4322/sc.2013.009>
- NETO, B.B.; BRUNS, R.E; SCARMINIO, I.S. Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4ª ed., São Paulo: Editora Bookman, **2010**.

NEUE, U.D.; SEROWIK, E.; IRANETA, P.; ALDEN, B.A.; WALTER, T.H. Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings. *J. Chromatogr. A*, v. 849, p.87-100, **1999**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00435-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00435-5)

NOME, R.C. Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa a partir da imobilização térmica do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre sílica aluminizada. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, **2014**.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; Godoy, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. *Rev. Virtual Quím.*, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, **2015**. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150069>

PENTEADO, J.C.P.; SEOUD, O.A. EL; CARVALHO, L.R.F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Quím. Nova*, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, **2006**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500025>

PRADO, A.G.S.; FARIA, E.A.; PADILHA, P.M. Application and chemical modification of silica-gel obtained from sand. *Quím. Nova*, v. 28, p. 544-547, **2005**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300030>

QIU, H.; LIANG, X.; SUN, M.; JIANG, S. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.*, v. 399, p. 3307–3322, **2011**. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4611-x>

RICHTER, J.E.; KAHRILAS, P.J.; JOHANSON, J.; MATON, P.; BREITER, J.R.; WANG, C.H.; MARINO, V.; HAMELIN, B.; LEVINE, J.G. Efficacy and safety of esomeprazole compared with omeprazole in GERD patients with erosive esophagitis: a randomized controlled trial. *AJG*, v. 96, n.3, **2001**. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(00\)02393-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(00)02393-5)

SANDER, L.C.; WISE, S.A. Certificate of Analysis, Standard Reference Material 869a, NIST, Gaithersburg, MD, 2002.

SANSEVERINO, A.M. Microondas em síntese orgânica. *Quím. Nova*, v. 25, p. 660-667, **2002**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000400022>

SHEN, J.; TOMOYUKI, I.; OKAMOTO, Y. Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1363, p. 51-61, **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.042>

SILVA, C.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím. Nova*, v. 27, n. 2, p. 270-276, **2004**. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000200017>

SILVA JUNIOR, E.S. Preparação de fases estacionárias para CLAE com uma mistura de poli(dimetilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano) sorvidos e imobilizados por tratamento térmico sobre sílica metalizada. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, **2014**.

SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D.; BREITBACH, Z.S.; BARBER, W.E.; MICKE, G.A.; ARMSTRONG, D.W. Superficially porous particles vs. fully porous particles for bonded high performance liquid chromatographic chiral stationary phases: Isopropyl cyclofructan. *J. Chromatogr. A*, v. 1363, p. 89-95, **2014**.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.022>

SZABO, K.; HA, N.; SCHNEIDER, P.; ZELTNER, P.; KOVITTS, E. SZ. Monofunctional (Dimethylamino)silane as Silylating Agent. *HELVETICA CHIMICA ACTA*, v. 67, **1984**.

<https://doi.org/10.1002/hlca.19840670813>

TONHI, E. Preparação de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência recheadas com polissiloxanos (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, **2004**.

TONHI, E.; BACHMANN, S.; ALBERT, K.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: I. Physical and chemical characterizations. *J. Chromatogr. A*, v. 948, p. 97-107, **2002**.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01612-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01612-0)

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica. *J. Chromatogr. A*, v. 1075, p. 87-94, **2005**. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.110>

TRUDINGER, U.; MULLER, G.; UNGER, K.K. Porous zirconia and titania as packing materials for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 535, p. 111-125, **1990**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88938-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88938-X)

WEN, X.; WANG, H.; WEI, Y.; WANG, X.; LIU, C. Preparation and characterization of cellulose laurate ester by catalyzed transesterification. *Carbohydrate Polymers*, v. 168, p. 247-254, **2017**. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.074>

WILLBERG-KEYRILAINEN, P.; TALJA, R.; ASIKAINEN, S.; HARLIN, A.; ROPPONEN, J. The effect of cellulose molar mass on the properties of palmitate esters. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 988-995, **2016**.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.048>

WILLBERG-KEYRILÄINEN, P.; VARTIAINEN, J.; HARLIN, A.; ROPPONEN, J. The effect of side-chain length of cellulose fatty acid esters on their thermal, barrier and mechanical properties. *Cellulose*, v. 24, p. 505-517, **2017**. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1165-x>

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. *Colloids Surf., A*, v. 173, p. 1-38, **2000**. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00556-2)