



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



LAÍS DE MOURA BIFE CASTILHO

**PROPRIEDADES DE RETENÇÃO E APLICABILIDADE DA FASE
POLI(GLICIDOXIPROPILMETIL-CO-DIMETILSILOXANO) PARA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

ITUIUTABA/MG

2020

LAÍS DE MOURA BIFE CASTILHO

**PROPRIEDADES DE RETENÇÃO E APLICABILIDADE DA FASE
POLI(GLICIDOXIPROPILMETIL-CO-DIMETILSILOXANO) PARA
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

ITUIUTABA/MG

2020

LAÍS DE MOURA BIFE CASTILHO

**PROPRIEDADES DE RETENÇÃO E APLICABILIDADE DA FASE
POLI(GLICIDOXIPROPIL-CO-DIMETILSILOXANO) PARA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

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

Ituiutaba, 16 de dezembro de 2020

COMISSÃO AVALIADORA

Profa. Dra. Dayane Fonseca Soares / IFTM, *campus* Ituiutaba

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Veridiana e Carlos, a minha irmã Beatriz, ao Dr. Anizio Marcio de Faria, ao Me. Allyson Leandro Rodrigues dos Santos e aos meus amigos pelo carinho, paciência e todos os ensinamentos que me ajudaram a crescer e a atingir meus objetivos.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me ajudar a escolher uma faculdade na qual eu me sentisse feliz e realizada.

Agradeço aos meus pais Veridiana e Carlos, a minha irmã Beatriz e a todos os meus familiares que me apoiaram, ajudaram e torceram por mim durante essa jornada. Sem vocês não teria conseguido essa conquista.

Ao Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria, primeiramente pelo aceite de me orientar, por toda dedicação e paciência. Agradeço por ser um excelente profissional que inspira seus alunos a serem mais dedicados e por todos os seus ensinamentos.

Aos discentes e técnicos de laboratório obrigada por compartilhar os seus ensinamentos e experiências.

Ao meu grupo de pesquisa CroMat e por todos os amigos de laboratório obrigada pelos incentivos, troca de ideais e companheirismo; em especial ao Me. Allyson Leandro pelas broncas e elogios que me ajudaram a crescer como profissional e como pessoa, por toda a dedicação e também por sempre me ajudar.

Aos meus amigos de graduação Rafaela, Kátia, Eduarda, Naiad e Renan pelas risadas, brigas, lamentações e por estarem comigo durante essa trajetória.

Agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

EPÍGRAFE

*“Os sonhos não determinam o lugar que você vai
estar, mas produzem a força necessária para o
tirar do lugar em que está.”
(Augusto Cury)*

RESUMO

As fases estacionárias (FE) são as principais responsáveis por todo o processo químico e físico-químico de separação das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência. Apesar de todo avanço alcançado em termos de desempenho e seletividade, os materiais convencionais baseados em Sílica-C₁₈ ainda são limitados em relação à análise de substâncias hidrofílicas, apresentando baixa retenção e dificuldade de separação. FE recobertas com polímeros com grupamentos hidrofílicos apresentam-se como uma alternativa para os materiais convencionais, fornecendo maior retenção e melhor separação para substâncias hidrofílicas. Neste trabalho uma fase estacionária baseada na imobilização térmica do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) sobre sílica, Si(PGPMS), será avaliada como alternativa simples e de baixo custo para análise eficiente de misturas de compostos polares. Para tal, as propriedades de retenção cromatográfica da fase Si(PGPMS) foram estudadas a partir da separação de protocolos de misturas testes padrão (mistura hidrofílica, Protocolo de Tanaka, NIST SRM 870®), o que possibilitou estabelecer que a fase estacionária Si(PGMS) atua como fase reversa, eluindo primeiramente compostos mais polares e posteriormente compostos hidrofóbicos. As fases Si(PGPMS) apresentam uma peculiaridade em relação a composição da fase móvel (FM) nas análises das misturas testes padrão, tendo em vista que o aumento da porcentagem de água na FM resultou em um melhor desempenho e uma maior eficiência na separação de compostos polares. A partir destas informações, a potencialidade de aplicação da fase Si(PGPMS) foi avaliada pela separação de uma mistura de fármacos, obtendo separação eficiente com uma alta porcentagem de água na fase móvel.

Palavras-chave: Fases estacionárias, imobilização térmica, poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano), compostos polares, cromatografia líquida em fase aquosa.

ABSTRACT

The stationary phases are the main responsible for the entire chemical and physical-chemical process of separation by high-performance liquid chromatography. Despite all the advances achieved in terms of performance and selectivity, conventional materials based on Silica-C₁₈ are still limited in relation to the analysis of hydrophilic substances, with low retention and difficulty in separation. Polymer-coated stationary phases containing hydrophilic groups are presented as an alternative to conventional materials, providing greater retention and better separation for hydrophilic substances. In this work, a phase based on the thermal immobilization of poly(glycidoxypropylmethyl-co-dimethylsiloxane) on silica, Si(PGPMS), was evaluated as a simple and low-cost alternative stationary phase for efficient analysis of mixtures of polar compounds. For this purpose, the chromatographic retention properties of the Si(PGPMS) phase were studied from the separation of protocols from standard test mixtures (hydrophilic mixture, Tanaka Protocol, NIST SRM 870[®]), which made it possible to establish that the Si(PGMS) acts as a reversed-phase, eluting more polar compounds first and then hydrophobic ones. The Si(PGPMS) phase presents a peculiarity in relation to the composition of the mobile phase in the analysis of the standard test mixtures, considering that the increase in the percentage of water in the mobile phase resulted in better performance and greater efficiency in the polar compound separation. From this information, the potential application of the Si(PGPMS) phase was evaluated in the separation of a mixture of drugs, obtaining efficient separation with a high percentage of water in the mobile phase.

Keywords: Stationary phases, thermal immobilization, poly(glycidoxypropylmethyl-co-dimethylsiloxane), polar compounds, *per-aqueous* liquid chromatography.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
CroMat	Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia
d_p	Diâmetro de poro
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FR	Fase reversa
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
k_{PB}	Hidrofobicidade
LEMUP	Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal
MeOH	Metanol
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si)
NP-LQ	<i>Normal-phase liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de fase normal)
PEO	<i>Poly(ethylene oxide)</i> (Poli(óxido de etileno))
PGPMS	Poli(glicidoxipropilmetil- <i>co</i> -dimetilsiloxano)
RP-LC	<i>Reversed-phase liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de fase reversa)
Si(PGPMS)	Fase estacionária baseada na imobilização térmica de poli(glicidoxipropilmetil- <i>co</i> -dimetilsiloxano) sobre a sílica
SRM	Standard Reference Material
TG	Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)
V_p	Volume de poro
$\alpha_{B/F \text{ pH } 2,70}$	Capacidade de troca iônica em meio ácido
$\alpha_{B/F \text{ pH } 7,60}$	Capacidade de troca iônica total
$\alpha_{C/F}$	Capacidade de ligação de hidrogênio
α_{CH2}	Seletividade hidrofóbica
$\alpha_{T/O}$	Seletividade estérica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores. _____	27
Tabela 2. Composição da mistura SRM 870 e as condições de análise. _____	28
Tabela 3. Condições estabelecidas para a degradação rápida. _____	30
Tabela 4. Propriedades de retenção cromatográfica da fase Si(PGPMS) e KROMASIL C18. _____	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica.....	16
Figura 2. Estrutura química do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano). m e n nº de repetições dos monômeros na estrutura polimérica.....	19
Figura 3. Fluxograma do processo de preparação da fase estacionária Si(PGPMS).....	24
Figura 4. Fluxograma do processo da preparação da fase Si(PGPMS) imobilizada termicamente e posteriormente sua lavagem.	24
Figura 5. Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica.	25
Figura 6. Estruturas químicas dos componentes da mistura teste 2. (a) Uracila, (b) benzonitrila, (c) fenol, (d) tolueno, (e) benzilamina.....	28
Figura 7. Estruturas químicas dos fármacos avaliados pela fase Si(PGPMS). a) Sulfassalazina, b) ranitidina, c) hidroclorotiazida , d) furosemida e e) cimetidine.....	29
Figura 8. Curvas termogravimétricas para o PGPMS e a fase Si(PGPMS).	31
Figura 9. Espectros de ^{29}Si NMR para o suporte de sílica nua e para a fase Si(PGPMS).....	33
Figura 10. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica composta de (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtida pela fase Si(PGPMS). (a) FM MeOH:H ₂ O (60:40, v/v); (b) FM MeOH:H ₂ O (50:50, v/v). Vazão FM 0,4 mL min ⁻¹ , detecção UV 254 nm.	34
Figura 11. Curva de van Deemter para fase estacionária Si(PGPMS), com fase móvel MeOH:H ₂ O (50:50, v/v), obtida da separação da mistura teste hidrofóbica. Solute-teste: naftaleno.....	36
Figura 12. Gráfico radar dos parâmetros de retenção obtidos pelo protocolo de Tanaka para as fases Si(PGPMS) e Kromasil C ₁₈	38
Figura 13. Cromatograma separação Mistura Tanaka 1 composta de (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) o-terfenila e (5) trifenileno obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:H ₂ O (50:50, v/v), vazão 0,5 mL min ⁻¹	39
Figura 14. Cromatograma da separação mistura SRM 870 composta de (1) uracila, (2) tolueno (3) etilbenzeno, (4) quinizarina e (5) amitriptilina obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:Tampão fosfato (80:20, v/v), injeção de 20 µL, vazão 1 mL min ⁻¹ . Detecção UV (a) 210 nm, (b) 254 nm e (c) 480 nm.	40
Figura 15. Cromatograma da separação da mistura SRM 870 composta de 1) uracila, 2) tolueno, 3) etilbenzeno, 4) quinizarina e 5) amitriptilina obtida pela fase Cortecs. FM MeOH:Tampão fosfato (80:20, v/v), vazão 1 mL min ⁻¹ . Detecção UV a) 210 nm, b) 254 nm e c) 480 nm.	41
Figura 16. Cromatograma da separação da mistura SRM 870 composta de 1) uracila, 2) tolueno, 3) etilbenzeno, 4) quinizarina e 5) amitriptilina obtida pela fase Si(PGPMS), FM MeOH:Tampão fosfato (60:40, v/v), vazão 1 mL min ⁻¹ . Detecção UV a) 210 nm, b) 254 nm e c) 480 nm.	42

Figura 17. Exemplos de separações da mistura SRM 870® por colunas comerciais recheadas com fases C ₁₈ .	44
Figura 18. Estudo da degradação da fase estacionária Si(PGPMS) e a fase estacionária C ₁₈ .	45
Figura 19. Cromatogramas da separação da mistura teste composta de 1) uracila, 2) benzonitrila, 3) benzeno, 4) tolueno e 5) naftaleno obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:H ₂ O (60:40, v/v). Vazão FM 0,5 mL min ⁻¹ , detecção UV 254. nm. a) Antes do teste e b) após o teste de estabilidade.	46
Figura 20. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila, (5) tolueno obtida pela fase Si(PGPMS). FM ACN:H ₂ O (a) (40:60, v/v), (b) (30:70, v/v); (c) (20:80, v/v); (d) (10:90, v/v). Detecção UV 220 nm. Vazão 1,0 mL min ⁻¹ .	47
Figura 21. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila e (5) tolueno obtida pela fase Si(PGPMS). FM ACN:H ₂ O (10:90, v/v) 0-7 min e ACN:H ₂ O (50:50,v/v) de 7-15 min. Detecção UV 254 nm. Vazão 1,0 mL min ⁻¹ .	48
Figura 22. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila, (5) tolueno obtida pela fase Cortecs. FM ACN:H ₂ O (10:90, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão 1,0 mL min ⁻¹ .	49
Figura 23. Cromatograma da separação da mistura de fármacos composta por (1) hidroclorotiazida, (2) furosemida, (3) sulfassalazina, (4) cimetidina e (5) ranitidina obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:solução acetato de amônio 0,05 mol L ⁻¹ (5:95, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão 0,5 mL min ⁻¹ .	50
Figura 24. Cromatograma da separação da mistura de fármacos composta por (1) hidroclorotiazida, (2) furosemida, (3) sulfasalazina, (4) cimetidina e (5) ranitidina obtido pela fase (a) C ₁₈ X-Select e (b) HILIC Cortecs. FM MeOH:solução acetato de amônio 0,05 mol L ⁻¹ (5:95, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão 0,5 mL min ⁻¹ .	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Suportes cromatográficos	16
1.2 Fases estacionárias com polímeros imobilizados	18
2 OBJETIVOS	21
3 EXPERIMENTAL	22
3.1 Materiais, vidrarias e equipamentos	22
3.2 Reagentes e solventes	22
3.3 Preparação da fase estacionária Si(PGPMS)	23
3.3.1 Ativação da sílica	23
3.3.2 Sorção do PGPMS no suporte de sílica	23
3.3.3 Imobilização térmica do PGPMS sobre a sílica	24
3.3.4 Enchimento da coluna cromatográfica com a fase Si(PGPMS)	25
3.3.5 Condicionamento da coluna cromatográfica	25
3.3.6 Preparação da fase móvel	26
3.4 Caracterização físico-química da fase Si(PGPMS)	26
3.4.1 Análise termogravimétrica	26
3.4.2 Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si	26
3.5 Avaliação cromatográfica da fase Si(PGMS)	27
3.6 Aplicação da fase estacionária Si(PGPMS)	28
3.7 Avaliação da estabilidade hidrolítica da fase Si(PGPMS)	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização físico-química da fase Si(PGPMS)	31
4.1.1 Análise termogravimétrica	31
4.1.2 Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si	32
4.2 Caracterização cromatográfica da fase Si(PGPMS)	33
4.2.1 Mistura teste hidrofóbica	34
4.2.2 Protocolo de Tanaka e colaboradores	36
4.2.3 Mistura NIST SRM 870 [®]	39
4.3 Avaliação da estabilidade química da fase Si(PGPMS)	45
4.4 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(PGPMS)	46
4.4.1 Separação de compostos polares pequenos	47
4.4.2 Separação de fármacos básicos e sulfacompostos	49

5 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os métodos de separação estão presentes durante quase toda história da humanidade (COLLINS, 2009). Procedimentos como remoção de contaminantes por filtração em areias ou de excesso de sal por contato com certas folhas encontram-se descritas na Bíblia e em trabalhos gregos e egípcios antigos. Processos de separação como destilação e extração por solvente foram utilizados pelos alquimistas. No século XVI foram apresentados os resultados da “adsorção” em um processo de preparação de vinho branco a partir o vinho tinto. O procedimento de “filtração”, no século XIX, foi aplicado em diferentes sólidos para remoção de alguns componentes ou fracionamento de líquidos, enquanto outros fizeram esses fracionamentos em papel (COLLINS, 2009).

O século XX foi considerado como o “século da cromatografia”, levando em consideração que essa técnica foi permitiu o desenvolvimento de várias áreas das ciências físicas e biológicas durante todo esse século. No momento, existem indicações que a cromatografia e suas técnicas relacionadas também proporcionarão relevantes contribuições no século XXI (COLLINS, 2009).

Dentro das técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) é a técnica de separação mais versátil e mais abrangente para resolver misturas de compostos com as mais variadas estruturas químicas, tendo em vista que é uma técnica analítica empregada para fins qualitativos e quantitativos (TONHI *et al.*, 2002). A HPLC em menos de 30 anos passou a ser um método muito utilizado na indústria farmacêutica, em determinações ambientais, na indústria alimentícia entre outras (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009), principalmente devido às suas determinações com alta detectabilidade e à possibilidade de determinar espécies não voláteis (TONHI *et al.*, 2002).

A técnica HPLC consiste em um sistema de pressão elevada que força a passagem da fase móvel (FM) através de colunas fechadas que possuem a fase estacionária (FE) (HARRIS, 2010), dessa maneira a FM é capaz de distribuir os componentes da amostra pela FE, permitindo que os componentes seletivamente fiquem retidos pela fase estacionária. Essa pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna chegando até o detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A determinação da modalidade em que se atua a HPLC ocorre de acordo com os mecanismos de separação promovidos por suas fases móveis e fases estacionárias. A modalidade mais tradicional da HPLC é a cromatografia líquida de fase normal (NP-LC, *normal-phase liquid chromatography*), na qual emprega-se uma fase estacionária polar – sílica ou alumina – e uma

fase móvel apolar (VIGNA, 2004). Porém, a NP-LC é cada vez menos utilizada principalmente por usar fases móveis que empregam solventes mais tóxicos, como clorofórmio e diclorometano. Com isso uma segunda modalidade da HPLC ganhou mais espaço no meio acadêmico e industrial, essa modalidade é a cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC, *reversed-phase liquid chromatography*), na qual emprega-se uma fase estacionária constituída de uma camada fortemente apolar retida na superfície e poros de um suporte inorgânico e uma fase móvel com eluentes miscíveis em água, incluindo a água (MEYER, 2010).

A fase reversa apresenta uma série de vantagens em relação à fase normal, por isso vem sendo empregada em mais de 90 % dos laboratórios de análise. Esta popularidade da fase reversa é devido à (i) utilização de fases móveis menos tóxicas e mais baratas, como metanol e água; (ii) tendência em adquirir rápido equilíbrio da coluna após a mudança de fase móvel; (iii) boa reprodutibilidade dos tempos de retenção; (iv) possibilidade de eluição por gradiente, resultando em uma melhor separação e rapidez nas análises; (v) à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI et al., 2002).

A ampla aplicabilidade da RP-LC é o que impulsionou e continua impulsionando o desenvolvimento de novas fases estacionárias, uma vez que as fases estacionárias reversas possuem a inversão de seletividade com a introdução de grupos orgânicos sobre o suporte de sílica (MALDANER; JARDIM, 2010; FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

Dentre as FE, a mais comumente utilizada na modalidade de fase reversa são as do tipo organossilano, nas quais os agentes silanos, principalmente octadecilsilano (C_{18}) e octilsilano (C_8), se ligam quimicamente aos grupos silanóis da sílica (TONHI et al., 2002). Devido à interação entre a sílica e o agente organossilano ocorre uma maior estabilidade entre as ligações siloxano, provocando uma maior estabilidade hidrolítica à fase estacionária (MALDANER; JARDIM, 2010).

As fases quimicamente ligadas possuem desvantagens e a mais relevante delas é que somente um número limitado de grupos silanóis, 50%, reage com os sítios ativos do suporte cromatográfico. Os agentes silanos (C_{18} e C_8) empregados nas reações são volumosos causando o impedimento estérico para reações com sítios ativos vizinhos, que ocasionam baixa concentração do ligante na superfície da sílica. Os silanóis que não reagem (silanóis residuais) são ácidos e podem alterar o mecanismo da retenção da fase estacionária ao interagirem com compostos básicos. O ideal é que o suporte apresente a menor quantidade possível de silanóis residuais, sítios que não reagiram com o agente silano ou com as espécies orgânicas que são imobilizadas, sorvidas ou ligadas quimicamente no suporte cromatográfico. (KIRKLAND, 2004; ENGERLHARDT; BLAY; SAAR, 2005; FARIA, 2006).

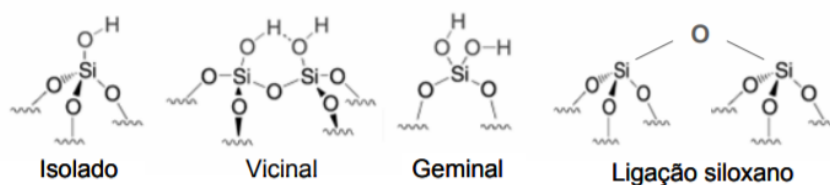
1.1 Suportes cromatográficos

As fases estacionárias reversas são compostas de uma camada orgânica sorvida, ligada quimicamente ou imobilizada fisicamente a um suporte cromatográfico inorgânico. Contudo, o material empregado como suporte necessita de características físico-químicas e morfológicas adequadas para que a FE apresente desempenho eficiente nas análises cromatográficas. O suporte cromatográfico ideal deve apresentar as seguintes características (FARIA, 2006):

- Ser suficientemente poroso, permitindo que o líquido seja absorvido por seus poros;
- Apresentar diâmetro médio de poros entre 5 e 100 nm, uma vez que poros muito estreitos dificultam a transferência de massa podendo ocorrer efeitos de exclusão por tamanho, ao passo que poros largos impedem a fixação do líquido estacionário por força capilar, e, desta forma o líquido pode ser removido com a passagem da fase móvel;
- Apresentar alta concentração de grupos ativos em sua superfície para favorecer a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação;
- Possuir área superficial específica suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra;
- Possuir resistência mecânica elevada para que o suporte seja capaz de resistir às altas pressões necessárias em RP-LC;
- Não apresentar reatividade química, para não reagir com os componentes da amostra.

Os suportes cromatográficos são baseados em polímeros inorgânicos, orgânicos ou híbridos. O óxido de silício (SiO_2), mais conhecido como sílica, é um suporte cromatográfico inorgânico e é o suporte mais utilizado na cromatografia por apresentar características mais adequadas, tais como: boa resistência mecânica, estabilidade química e térmica, área superficial e estrutura de poros controláveis e grupos silanóis (hidroxilas) suscetíveis a posteriores modificações (NAZARO; LANÇAS, 2013). A superfície da sílica apresenta pelo menos três tipos distintos de grupos hidroxilas, tais como os silanóis isolados ou livres, os silanóis vicinais e os geminais, como mostrado na Figura 1 (ZHURAVLEV, 2000).

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



Fonte: FARIA, 2006

As propriedades da superfície da sílica amorfa, que é considerada como um óxido adsorvente depende de dois fatores: (i) da concentração e distribuição dos grupos silanóis e (ii) da estrutura porosa da sílica (FARIA, 2006). Por exemplo, uma concentração suficiente dos grupos silanóis na sílica garante uma superfície altamente reativa e hidrofílica.

Contudo, as fases baseadas em sílica são limitadas por dois aspectos. O primeiro aspecto está relacionado a não homogeneidade da superfície da sílica, que apresenta distintos tipos de grupos silanóis, os quais prejudicam a funcionalização e o mecanismo de retenção. De acordo com a teoria de Bronsted-Lowry, os silanóis(-SiO-H) são ácidos e podem interagir com moléculas básicas, como fármacos, bio-orgânicos, entre outros, e adsorvê-las reversível ou irreversivelmente, ou seja, interagir fortemente com os grupos ácidos dos silanóis na superfície do suporte de sílica que não foram protegidos pela camada orgânica. Quando a adsorção é reversível a adsorção, tem-se a adversidade de picos largos, assimétricos e com cauda, que são difíceis de serem resolvidos quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferirem nos picos de outros compostos que eluem com tempos de retenção parecidos. No caso da adsorção irreversivelmente, os compostos ficam depositados na superfície cromatográfica restringindo o transporte de massa, bloqueando sítios de interação e criando sítios não específicos, afetando o desempenho da coluna, podendo levar à deterioração da fase estacionárias (TONHI et al. 2002).

O outro aspecto limitante é a instabilidade da sílica e das fases estacionárias baseadas em sílica causada por fases móveis ácidas e básicas fora da faixa de pH 2 a 8. Essas fases móveis atacam os grupos silanóis e siloxanos provocando a perda da FE ou dissolvem o suporte gerando um colapso da estrutura da coluna. Dessa maneira, reduzindo o campo de atuação da RP-LC, tendo em vista que FM com pH fora da faixa de 2 a 8 são amplamente recomendadas para separações de diversos componentes, contendo em suas estruturas agrupamentos básicos ou ácidos, tais como os encontrados em diversas classes de agrotóxicos, drogas ilícitas, biocompostos e fármacos (FARIA, 2006). Em fases móveis de pH < 2, ocorre a hidrólise ácida das ligações Si-C entre a superfície da sílica e o material quimicamente ligado. Enquanto em fases móveis com pH > 8 acontece a rápida dissolução da sílica devido a conversão do óxido de silício em silicato, como este composto é solúvel em água e na RP-LC a maior parte das separações incluem água na fase móvel, ocorre a clivagem da fase estacionária quimicamente ligada ao suporte. A dissolução da sílica leva a uma progressiva e rápida perda do desempenho cromatográfico, produzindo uma lacuna no topo da coluna e uma acentuada queda de pressão no sistema cromatográfico (TONHI et al. 2002; SANTOS, 2016).

Diante dos empecilhos citados para as fases estacionárias quimicamente suportadas em sílica, cientistas de separação estudam alternativas para melhorar a estabilidade química e, principalmente, diminuir a atividade silanofílica da fase estacionária para analisar compostos polares e básicos de forma mais eficiente (ZHANG *et al.*, 2020). Dentre essas propostas destacamos a preparação de fases estacionárias por imobilização de polímeros pré-sintetizados.

1.2 Fases estacionárias com polímeros imobilizados

Uma solução encontrada para diminuir os silanóis residuais nas fases estacionárias é o emprego do recobrimento superficial da sílica com polímeros orgânicos pré-sintetizados e, dessa maneira, combinar a resistência mecânica do óxido inorgânico do suporte com a versatilidade e inércia química dos polímeros orgânicos (SEGATO, 2011).

Essas FE produzidas apresentam algumas vantagens, tais como: uma maior seletividade proveniente do grupo imobilizado sobre a sílica; um maior recobrimento dos sítios ativos do suporte em comparação com as FE ligadas quimicamente, e uma maior proteção do suporte de sílica contra ataques químicos das fases móveis (CHAUDHRY, 2005).

Existem duas principais formas de realizar a sorção do polímero sob a sílica. O primeiro método é por deposição de camadas do polímero pré-sintetizado sorvidas na superfície e nos poros do suporte. Enquanto o segundo método envolve a polimerização *in situ* de monômeros sorvidos no suporte. Contudo, o primeiro procedimento é o mais estudado devido à repetibilidade da quantidade sorvida do polímero no suporte, resultando em melhor repetibilidade dos parâmetros de retenção de coluna para coluna (FARIA; COLLINS; JARDIM, 2009).

Após o recobrimento do suporte pelo polímero podem-se realizar procedimentos para a imobilização (fixação mais forte) do polímero sobre o suporte, como por exemplo, tratamento térmico, por irradiação gama ou irradiação por micro-ondas (CARVALHO; SILVA; FARIA, 2016). O tratamento térmico se destaca pela simplicidade de uso e pela instrumentação simples necessária. Além disso, não é necessário nenhum reagente químico adicional para fixar a camada polimérica no suporte de sílica (DIB; FARIA, 2014).

1.3 Imobilização polimérica via tratamento térmico

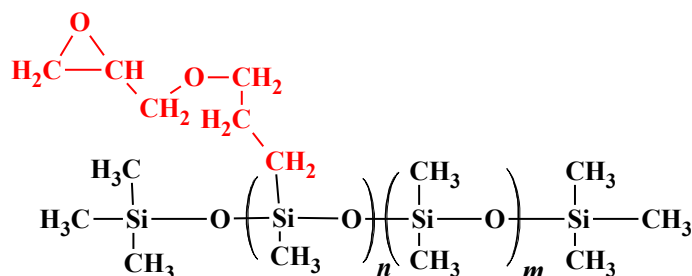
A imobilização polimérica é um método importante no preparo de fases estacionárias para RP-LC. Isso ocorre devido a imobilização de um polímero sobre a superfície da sílica

resultar em uma melhor proteção dos grupos ativos do suporte, uma vez que o polímero recobre uma maior extensão da sua superfície, permitindo que a FE seja mais estável em uma faixa mais ampla de pH (SANTOS, 2016).

O tratamento térmico é uma das formas de realizar a imobilização polimérica sobre o suporte cromatográfico. O tratamento térmico consiste no aquecimento do tubo ou frasco contendo a fase estacionária recém-preparada e seca e, em seguida, ocorre a transferência de calor do recipiente para a amostra. Este processo é empregado para fixar o polímero no suporte, auxiliando no processo de adsorção (BOTTOLI *et al.*, 2004). A adsorção é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário considerável período de tempo para que as moléculas do polímero se reorganizem de tal maneira a formarem uma camada estável e uniforme sobre a superfície do suporte cromatográfico (CARVALHO, 2017; BOTTOLI *et al.*, 2004).

Neste trabalho foi estudado como recobrimento de fase estacionária um copolímero pré-sintetizado, o poli(glicidoxipropilmetil-*co*-dimetilsiloxano) (PGPMS). A Figura 2 apresenta a estrutura do polímero citado.

Figura 2. Estrutura química do poli(glicidoxipropilmetil-*co*-dimetilsiloxano). *m* e *n* nº de repetições dos monômeros na estrutura polimérica.



O PGPMS apresenta em sua estrutura monomérica um grupo polar glicidóxi da qual espera proporcionar à FE uma seletividade adequada para separar compostos polares. Substâncias polares apresentam dificuldade de retenção nas fases estacionárias reversas convencionais, já que o C₁₈ se apresenta como um grupamento fortemente hidrofóbico, oferecendo pouca retenção para tais compostos e provocando uma dificuldade de separação (MALDANER; JARDIM, 2010). O grupo glicidóxi do PGPMS é capaz de formar unidades de glicol por abertura hidrolítica do anel epóxi, formando cadeias de diferentes comprimentos de óxido de polietileno (PEO, *poly(ethylene oxide)*) por polimerização. Os grupos epóxi reagem para formar cadeias de PEO a partir da foto-polimerização e pela indução de calor através de catalisadores básicos ou ácidos. Além disso, o anel epóxi do PGPMS pode sofrer abertura, a qual

pode permitir a formação de um poli(óxido de etileno) sob condições certas da fase móvel. A estrutura desse anel epóxi é formada por um átomo de oxigênio unido a dois átomos de carbono que por sua vez estão unidos por uma ligação covalente (GAMA, 2017).

2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo principal avaliar as características de retenção e a aplicabilidade de uma nova fase estacionária preparada a partir de imobilização térmica do poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) sob partículas de sílica cromatográfica – Si(PGPMS). O preparo da fase Si(PGPMS) foi otimizado por Gama (2017). Neste trabalho, para cumprir o objetivo proposto, a fase estacionária preparada sob as condições otimizadas foi caracterizada cromatograficamente através da separação de protocolos testes padrão para avaliar as propriedades de retenção da fase Si(PGPMS). A fase foi aplicada na separação de mistura de compostos polares e de fármacos com características polares e básicas que não são bem resolvidos na RP-LC, empregando as fases estacionárias disponíveis comercialmente. Adicionalmente, a estabilidade química e térmica da fase Si(PGPMS) foi avaliada através da caracterização físico-química e um teste de degradação rápida da fase estacionária.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, vidrarias e equipamentos

Para o preparo das fases estacionárias Si(PGPMS) foram utilizados béqueres de 5 e 25 mL; agitador magnético; barra magnética; pipetas de Pasteur; espátulas; provetas de 10 e 25 mL; tubos de ensaio com tampa rosqueável de 20 mL; funis de vidro; tubos de ensaio; balança eletrônica com precisão de 0,0001 g (Acculab, Bradford, MA, EUA); centrífuga (Celm, modelo combate, São Caetano do Sul, Brasil); ultrapurificador de água (MegaPurity®, Billerica, EUA) e mufla (JUNG, Blumenau, Brasil). Foram empregadas também duas colunas comerciais fabricadas pela Waters (Wexford, Irlanda): (1) coluna X-Select HSS T3, com partículas de 3,5 mm e dimensões de 4,6 mm x 150 mm, lote 0123363331; (2) coluna Cortecs HILIC, com partículas de 2,7 mm, MVK e dimensões de 4,6 mm x 150 mm, lote 0102370061.

Para o preparo da fase móvel, foram utilizadas membranas de nylon® (Millipore®, Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 µm e diâmetro de 45 mm; sistema de filtração de fase móvel; funil; bomba de vácuo; kitassato de 500 mL; e banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil).

Para análise das misturas de compostos padrão pelas fases estacionárias produzidas nesse trabalho foram realizadas medidas em um Cromatógrafo a líquido Waters e2695 (Danbury, CT, EUA), com sistema de detecção de arranjo de diodos modelo 2998 PDA, gerenciado pelo software Empower3®.

3.2 Reagentes e solventes

Para o preparo das fases estacionárias Si(PGPMS) imobilizadas termicamente foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: sílica cromatográfica (partículas de diâmetro médio de 5 µm); poli(glicidoxipropilmetil-co-dimetilsiloxano) da UnitedChem (Bristol, PA, EUA); tolueno grau espectroscópico; hexano grau PA; metanol grau HPLC, 99,5 % (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil); clorofórmio grau espectroscópico, 99 % (Tedia); água ultrapurificada a 18,3 MΩ cm.

Foram utilizados durante a caracterização das fases os seguintes compostos padrão obtidos da Sigma-Aldrich: uracila, 99 %; tolueno, 99,8 %; benzeno, 99,9 %; benzonitrila, 99 %; butilbenzeno, 99 %; pentilbenzeno, 99 %; *o*-terfenila, 99 %; trifenileno, 98 %; etilbenzeno benzilamina, 99 %; quinizarina, 96 %. Foram utilizados também o naftaleno, 99 %; fenol 99,5

%, e; cafeína 98 % da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os padrões secundários de amitriptilina, furosemida, cimetidina, hidroclorotiazida, sulfasalazina e ranitidina foram obtidos em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Ituiutaba/MG.

3.3 Preparação da fase estacionária Si(PGPMS)

3.3.1 Ativação da sílica

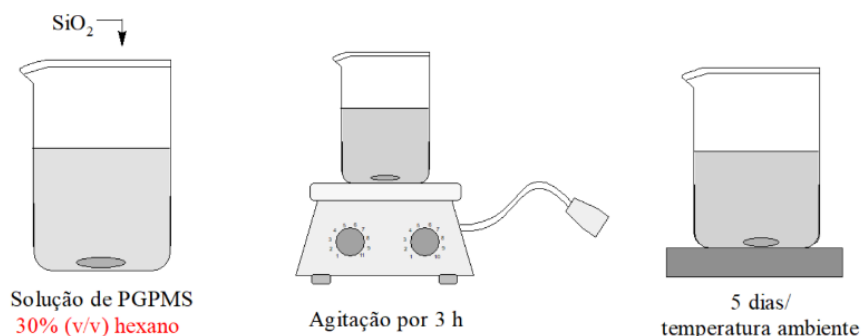
Inicialmente, as partículas de sílica cromatográfica foram ativadas através da liberação de moléculas de água adsorvidas em sua superfície. Foram pesados 1,5 g de sílica cromatográfica em um béquer e aquecido a uma temperatura de 140 °C por 12 h com o auxílio de uma mufla, o béquer foi parcialmente coberto com papel alumínio previamente furado para liberação do vapor de água.

3.3.2 Sorção do PGPMS no suporte de sílica

Foram adicionados 10 mL de hexano (coluna de 50 milímetros) ou 30 mL de hexano (coluna 150 milímetros) em um béquer de 25 mL ou 50 mL juntamente com uma barra magnética, deixando sob agitação branda. Lentamente, foi adicionada a quantidade adequada de PGPMS (0,300 g para coluna de 50 milímetros ou 0,900 g para coluna de 150 milímetros). A solução foi deixada sob agitação magnética branda durante 10 min.

Após esse período, adicionou-se aproximadamente 1,000 g de sílica, previamente ativada a 140 °C por 12 h, ao béquer que continha a solução de PGPMS. A suspensão da sílica na solução de PGPMS foi deixada sob agitação magnética branda por 3 h. Em seguida, o béquer foi retirado da agitação e coberto com uma folha de papel alumínio previamente furada. O béquer foi deixado em repouso por aproximadamente 5 dias para que todo o solvente fosse evaporado à temperatura ambiente. A Figura 3 apresenta de forma esquemática o processo de preparação da fase.

Figura 3. Fluxograma do processo de preparação da fase estacionária Si(PGPMS).

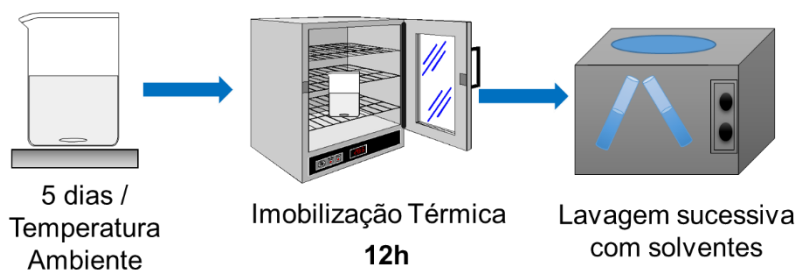


3.3.3 Imobilização térmica do PGPMS sobre a sílica

Após o período de 5 dias a fase estacionária Si(PGPMS) encontrava-se totalmente seca. A fase estacionária totalmente seca foi colocada na mufla a 90 °C durante 12 h, que foi otimizada anteriormente por GAMA (2017). Após essa etapa, obteve-se a fase Si(PGPMS) imobilizada termicamente.

Uma porção do polímero PGPMS não é imobilizada na superfície do suporte de sílica, portanto, esse resíduo deve ser removido. Para isso, o material sólido foi adicionado em quantidades aproximadamente iguais a 4 tubos de ensaio previamente limpos e secos. A cada tubo foram adicionados aproximadamente 3 mL de hexano e agitado com o auxílio de um agitador vórtex por 30 s. Os tubos foram levados à centrifuga por 2 min a 2500 rpm, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. O material sólido obtido foi seco a 60 °C em estufa por 1 h. A Figura 4 apresenta de forma esquemática o processo de imobilização e lavagem da fase.

Figura 4. Fluxograma do processo da preparação da fase Si(PGPMS) imobilizada termicamente e posteriormente sua lavagem.

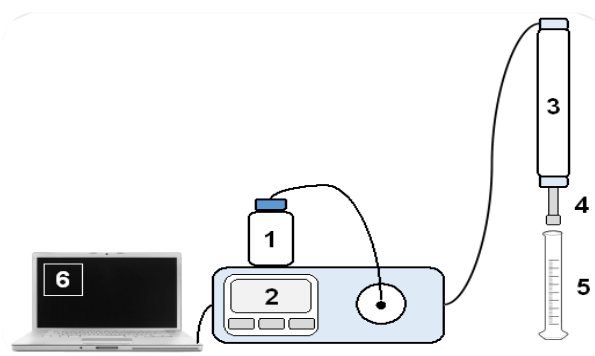


Fonte: Própria autora.

3.3.4 Enchimento da coluna cromatográfica com a fase Si(PGPMS)

Para o enchimento da coluna cromatográfica foi preparada uma suspensão com a fase Si(PGPMS) em clorofórmio. As suspensões consistiam em aproximadamente 1 g de Si(PGPMS) em 20 mL de clorofórmio filtrado. A suspensão foi agitada em vórtex. Após esse período, as suspensões foram transferidas para o sistema de enchimento de colunas, tal como apresentado na Figura 5. O reservatório do solvente propulsor (1) foi preenchido com metanol. Em seguida, a pressão da bomba (2) foi ajustada para um valor máximo de 9.000 psi. O reservatório de suspensão (3) contendo a coluna cromatográfica de 50 mm ou 150 mm de comprimento (4), devidamente colocada à sua extremidade. O volume do reservatório foi completado com o solvente de suspensão (clorofórmio) devidamente filtrado. Fechou-se a extremidade superior do reservatório de solvente pelo qual foi adicionada a FE. Com o sistema todo fechado, a bomba foi ligada através de acionamento no software Quick-set Pump® (6), que bombeou metanol para o sistema de enchimento, impulsionando a fase estacionária Si(PGPMS) para o interior da coluna cromatográfica. O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de aproximadamente 80 mL de solvente, que foram recolhidos em uma proveta de 100 mL (5), colocada logo abaixo do sistema de enchimento. A manutenção da pressão durante todo o procedimento de enchimento da coluna foi necessária para produzir uma boa e homogênea compactação. Depois de terminado o enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior fechada com um filtro terminal.

Figura 5. Sistema de enchimento e esvaziamento da coluna cromatográfica.



Fonte: Própria autora.

3.3.5 Condicionamento da coluna cromatográfica

Após o enchimento, a coluna cromatográfica foi conectada ao cromatógrafo a líquido, passando fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50 (v/v) por aproximadamente 1 h. Nessa

etapa uma das extremidades das colunas é acoplada na conexão das bombas cromatográficas, enquanto a outra extremidade foi ligada diretamente ao descarte.

3.3.6 Preparação da fase móvel

Os solventes constituintes da fase móvel (água, metanol, acetonitrila e soluções tampão: acetado de amônio 0,050 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,020 mol L⁻¹ a pH 7,00) foram medidos e filtrados individualmente utilizando-se de um sistema de filtração de fase móvel e uma membrana de 45 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poros. Em seguida, os solventes foram estocados em frascos separados e deixados por 20 minutos em banho ultrassom, para serem desgaseificados. Após desgaseificados, os solventes foram dispostos nos reservatórios para fase móvel do sistema cromatográfico.

3.4 Caracterização físico-química da fase Si(PGPMS)

3.4.1 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do PGPMS e da Si(PGPMS) foi avaliada por 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 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas sob atmosfera inerte em um analisador termogravimétrico, relacionando a perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Esta medida foi realizada no Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Pontal (LEMUP).

3.4.2 Ressonância magnética nuclear de ²⁹Si

As fases Si(PGPMS) foram analisadas por NMR ²⁹Si com polarização cruzada com rotação em um ângulo mágico (CP-MAS) no núcleo de silício. Os espectros foram obtidos para avaliar o tipo de interação do polímero PGPMS com o suporte cromatográfico e a presença de grupos silanóis residuais na superfície da sílica após a etapa de imobilização térmica do polímero. Medida realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/Unicamp).

3.5 Avaliação cromatográfica da fase Si(PGMS)

A avaliação cromatográfica das fases Si(PGPMS) foi realizada através da determinação dos parâmetros cromatográficos de uma mistura teste de compostos padrão. Os compostos foram detectados no comprimento de onda de 254 nm e as soluções injetadas sempre no volume 20 µL.

A primeira mistura padrão utilizada foi constituída de cinco compostos: benzeno, benzonitrila, naftaleno, tolueno e uracila. A ordem de eluição desses compostos indica o comportamento/modo de separação da fase Si(PGPMS). A mistura também foi utilizada para o estudo de vazão (Curva de Van Deemter) da fase móvel para a fase estacionária Si(PGPMS).

Com o objetivo de realizar uma caracterização cromatográfica mais completa também foram analisadas as misturas do Protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989), pela qual são determinadas as propriedades de retenção dos compostos em cada uma das misturas analisadas. Neste protocolo são analisadas quatro misturas distintas, em diferentes condições de fase móvel. As misturas e suas respectivas fases móveis são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Misturas testes padrão e condições de análise do Protocolo de Tanaka e colaboradores.

Misturas	Compostos	Condições de análise
MT-I	uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, <i>o</i> -terfenila e trifenileno	MeOH:H ₂ O, 80:20 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C
MT-II	uracila, cafeína e fenol	MeOH:H ₂ O, 30:70 v/v; detecção UV a 254 nm, temp. 25 °C
MT-III	uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato pH 7,60, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C
MT-IV	uracila, benzilamina e fenol	MeOH:tampão fosfato a pH 2,70, 30:70 v/v; detecção UV 254 nm, temp. 25 °C

MT: Mistura de Tanaka

Além das misturas propostas pelo Protocolo de Tanaka, uma mistura desenvolvida pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), designada Standard Reference Material SRM 870 (NIST, 2016), foi analisada pela fase estacionária Si(PGPMS). A Tabela 2 mostra a composição e condições de análise da mistura.

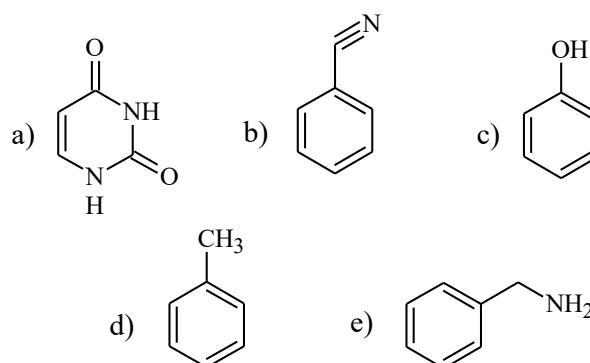
Tabela 2. Composição da mistura SRM 870 e as condições de análise.

MISTURA	COMPOSTOS	CONDIÇÕES DE ANÁLISE
NIST SRM 870	Uracila, tolueno, etilbenzeno, amitriptilina e quinizarina	MeOH:tampão fosfato pH 7, 80:20 v/v; detecção UV 254, 210 e 480 nm

3.6 Aplicação da fase estacionária Si(PGPMS)

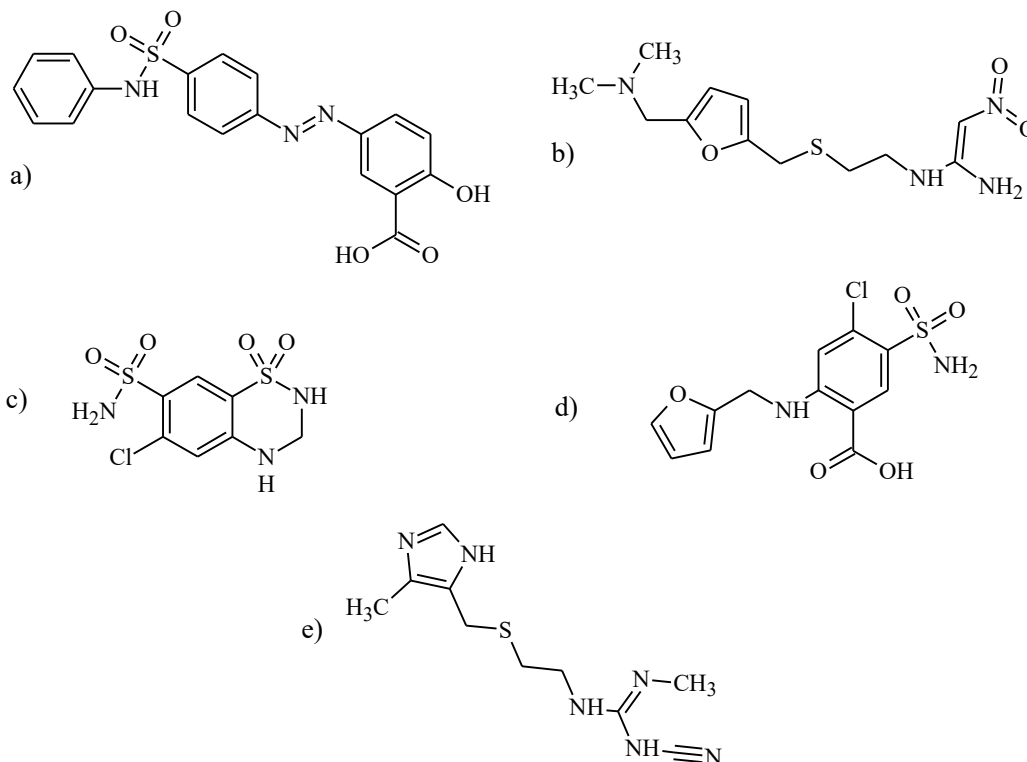
A fase Si(PGPMS) foi aplicada na separação de uma mistura de compostos polares e o tolueno (mistura teste 2), para avaliar sua potencialidade e seletividade para substâncias com características polares. A mistura teste 2 foi composta por uracila, benzonitrila, fenol, benzilamina e tolueno. As estruturas químicas de cada composto estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Estruturas químicas dos componentes da mistura teste 2. (a) Uracila, (b) benzonitrila, (c) fenol, (d) tolueno, (e) benzilamina.



A fase Si(PGPMS) foi aplicada também à análise de uma mistura de fármacos com características polares e básicas. A mistura foi composta por cimetidina, furosemida, hidroclorotiazida, ranitidina e sulfasalazina, cujas estruturas químicas estão na Figura 7.

Figura 7. Estruturas químicas dos fármacos avaliados pela fase Si(PGPMS). a) Sulfassalazina ($\lambda = 210\text{--}290\text{ nm}$), b) ranitidina ($\lambda = 210\text{--}250\text{ nm}$), c) hidroclorotiazida ($\lambda = 240\text{--}290\text{ nm}$), d) furosemida ($\lambda = 210\text{--}245\text{ nm}$) e e) Cimetidina ($\lambda = 210\text{--}250\text{ nm}$).



Cada fármaco possui uma importância medicinal apropriada. A furosemida é utilizada como diurético e vasodilatador (DIAS *et al.*, 2004); a cimetidina é indicada para o tratamento de úlceras no estômago e no duodeno, para tratar hemorragia gastrointestinal aguda (SAMPAIO *et al.*, 1979); a hidroclorotiazida é um diurético tiazídico empregado na terapêutica anti-hipertensiva (LAMOLHA; SERRA, 2007); a sulfassalazina é utilizada em tratamento de artrite reumatoide (PLOSKER; CROOM, 2012); e a ranitidina é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico e eficaz no tratamento de profilaxia de lesões gastrointestinais agravadas pela secreção de ácido gástrico (GRANT; LAGTRY; BROGDEN, 1989).

3.7 Avaliação da estabilidade hidrolítica da fase Si(PGPMS)

Algumas condições de análise podem afetar a vida útil das fases estacionárias, tais como: pH da FM, temperatura, concentração e tipo de tampão da fase móvel e composição da FM (GOMES; SANTOS; FARIA, 2020). Estas condições combinadas podem acelerar a degradação da fase estacionária e se tornarem um importante método de avaliação da estabilidade química das fases estacionárias, sem o uso de grandes quantidades de solventes e de funcionamento

prolongado do cromatógrafo. Desta forma, as condições degradantes foram empregadas para avaliar de forma rápida a estabilidade da fase Si(PGPMS) e compará-la com uma fase comercial C₁₈ sob as mesmas condições. As condições experimentais do método de avaliação da estabilidade da fase estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições estabelecidas para a degradação rápida.

Variáveis	Condições
pH	10
Tampão	Fosfato
Temperatura	45 °C
Concentração do tampão	25 mmol L ⁻¹
% solvente orgânico	60

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

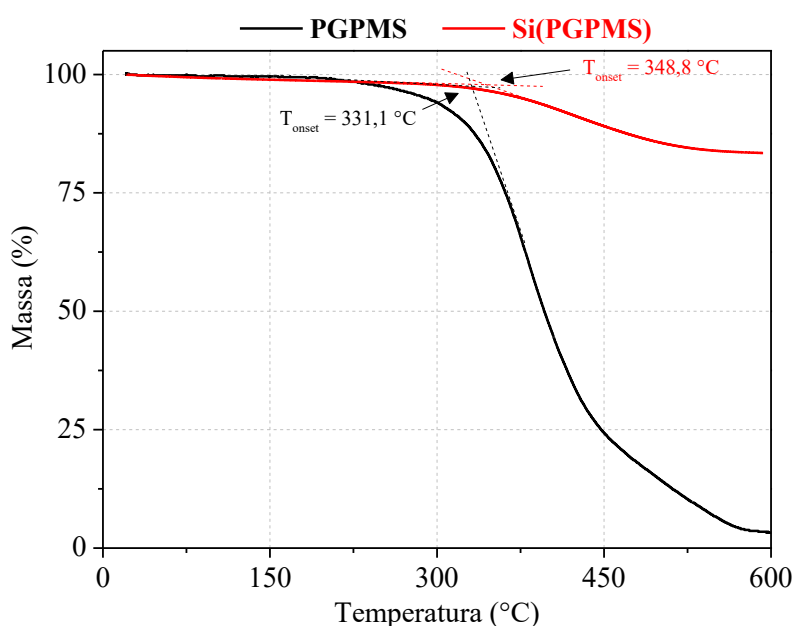
A fase Si(PGPMS) teve sua preparação otimizada por GAMA (2017) e foi avaliada neste trabalho quanto às suas propriedades cromatográficas de retenção e suas propriedades físico-químicas que estão associadas a estabilidade química e térmica da fase estacionária. Para tal, a fase Si(PGPMS) foi preparada sob as condições otimizadas e caracterizada por análise termogravimétrica e ressonância magnética nuclear de ^{29}Si para inferir sobre suas estabilidades térmica e química, respectivamente.

4.1 Caracterização físico-química da fase Si(PGPMS)

4.1.1 Análise termogravimétrica

O perfil termogravimétrico da fase Si(PGPMS) foi avaliado por análise termogravimétrica (TGA, *thermogravimetric analysis*) e comparado com o do copolímero puro. O objetivo dessa medida foi avaliar a estabilidade térmica da fase estacionária, uma vez que GAMA (2017) indicou uma alta estabilidade para o PGPMS puro em seu estudo. As curvas TG obtidas para o copolímero e para a fase Si(PGPMS) são apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Curvas termogravimétricas para o PGPMS e a fase Si(PGPMS).



De acordo com as curvas TG da Figura 9 pode-se observar que tanto o copolímero quanto a fase estacionária apresentam uma elevada estabilidade térmica, com temperaturas *onset* de

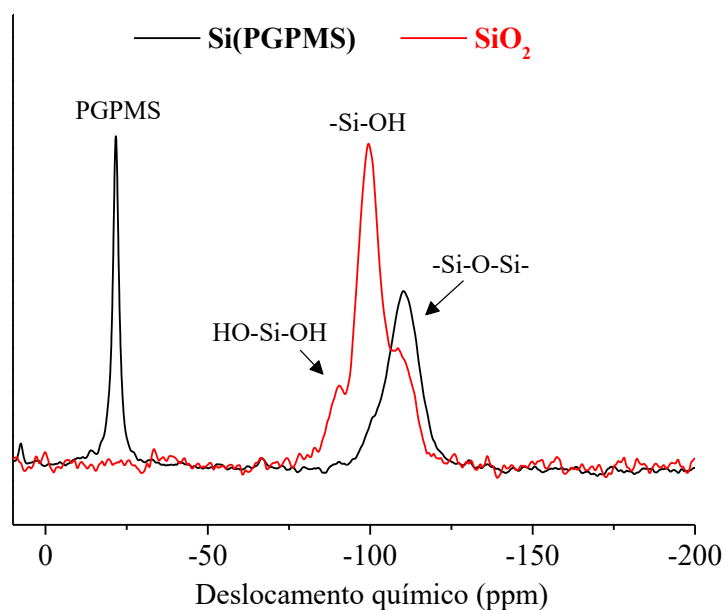
331,1 °C e 348,8 °C, respectivamente. A imobilização do PGPMS na superfície da sílica promoveu um ganho de estabilidade térmica provavelmente em função da ligação química do PGPMS sobre a sílica, que torna a estrutura polimérica menos acessível à decomposição térmica. É observado também que a fase Si(PGPMS) apresenta uma perda de massa de cerca de 3 % até 300 °C, que pode estar associado com a perda de moléculas de água adsorvidas na superfície do suporte não modificado. Essa quantidade é relativamente baixa quando comparada a outras fases estacionárias com polímeros imobilizados que apresentaram perdas superiores a 10 % (DIB, 2013). Esse pode ser considerado um indicativo do adequado recobrimento da superfície do suporte de sílica pela camada de PGPMS, tornando inacessível os grupos silanóis à adsorção das moléculas de água. A fase Si(PGPMS) apresenta um resíduo de 83 % de material em 600 °C, temperatura limite da análise, indicando a decomposição total do copolímero a partir dessa temperatura e restando apenas o material inorgânico. Considerando a perda de 3 % da massa inicial referente às moléculas de água adsorvidas e/ou solvente de preparação da fase estacionária, o teor de PGPMS na fase estacionária correspondeu, portanto, a cerca de 14 % em massa.

A alta estabilidade térmica alcançada pela fase Si(PGPMS) pode possibilitar o emprego da mesma em separações a temperaturas de colunas mais elevadas. Essa condição pode ser útil em separações de baixa eficiência, como aquelas que utilizam alto teor de água na FM, uma vez que sob elevadas temperaturas ocorre uma diminuição na viscosidade da FM e consequentemente uma maior taxa de transferência de massa dos solutos entre a FE e FM (TEUTENBERG, 2009).

4.1.2 Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si

A fase Si(PGPMS) foi caracterizada por ressonância magnética nuclear de silício 29 (NMR, *nuclear magnetic resonance*) para avaliar a imobilização do polímero na superfície e poros da sílica. Quando induzida quimicamente, a ligação do polímero aos sítios ativos do suporte de sílica resulta em um sinal característico no espectro de NMR ^{29}Si na região entre -10 a -50 ppm de deslocamento químico (BACHMANN *et al.*, 2001). Para fins de comparação, a sílica nua também foi avaliada por ^{29}Si NMR. Os espectros do suporte de sílica e da fase Si(PGPMS) são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Espectros de ^{29}Si NMR para o suporte de sílica nua e para a fase Si(PGPMS).



De acordo com os espectros de ^{29}Si NMR apresentados na Figura 9 é observada a redução e/ou desaparecimento de sinais característicos dos grupos reativos da superfície da sílica, $-\text{Si}-\text{OH}$ e $\text{HO}-\text{Si}-\text{OH}$, na fase Si(PGPMS) em comparação com o suporte de sílica, bem como é observado um sinal intenso em -23 ppm que é atribuído à ligação química do PGPMS com a superfície da sílica. Essas duas condições indicam que a imobilização do PGPMS empregando um procedimento físico como o tratamento térmico induziu a formação de ligação química, do tipo siloxano ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$), entre o polímero e o suporte cromatográfico. Além disso, o recobrimento da superfície do suporte de sílica foi eficiente, uma vez que os sinais referentes aos grupos silanóis reativos foram reduzidos drasticamente após a imobilização polimérica. Inclusive é observado um aumento na intensidade do sinal, em relação ao espectro de sílica nua, em -110 ppm referente à ligação $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$, provavelmente relacionado à ligação do PGPMS à sílica. Espera-se, portanto, que a formação da ligação química do PGPMS com o suporte de sílica e a redução dos grupos ativos (ácidos) da sua superfície devido ao maior recobrimento polimérico resultem em uma fase estacionária mais estável quimicamente e com menor atividade residual na separação de compostos básicos.

4.2 Caracterização cromatográfica da fase Si(PGPMS)

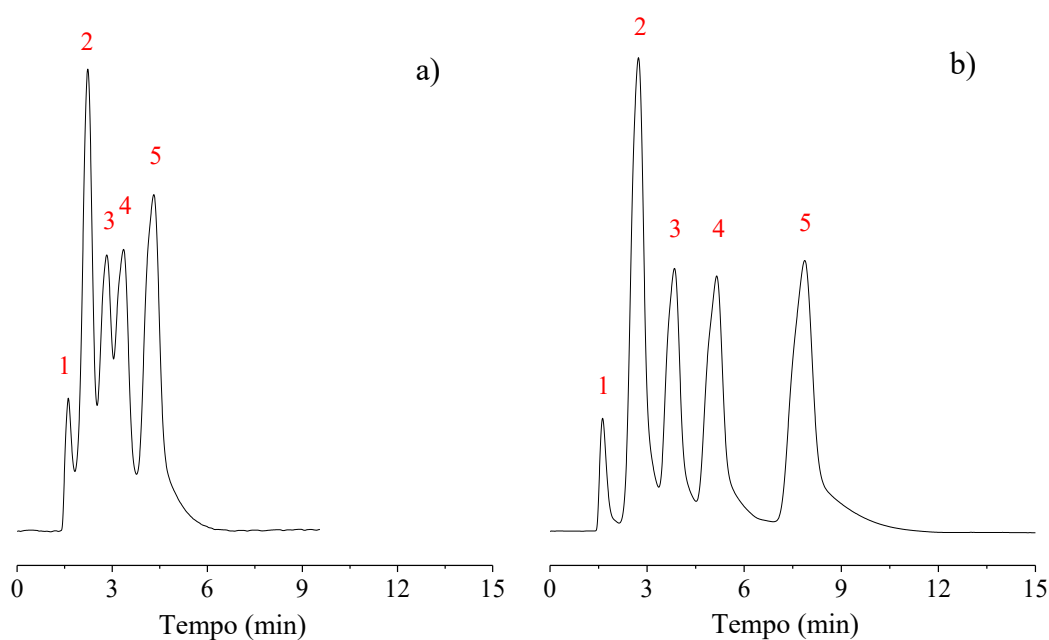
A caracterização cromatográfica de uma fase estacionária é realizada para determinar suas principais características de retenção, o que possibilita inferir sobre o tipo de substância

química mais adequado na aplicação da FE. Neste sentido, uma série de protocolos testes padrão estão disponíveis na literatura a fim de caracterizar da forma mais completa possível as propriedades retentivas de fases estacionárias para cromatografia líquida (KIMATA *et al.*, 1989; NIST, 2016; ENGELHARDT; JUNGHEIM, 1990). Neste trabalho foram empregadas misturas testes padrão desenvolvidas e comumente empregadas pelo CroMat para avaliação rápida das características da fase Si(PGPMS), bem como protocolos bem estabelecidos como o protocolo de Tanaka e a mistura teste padrão no NIST, SRM 870[®], para uma caracterização completa da FE.

4.2.1 Mistura teste hidrofóbica

Primeiramente, realizaram-se análises de uma mistura padrão hidrofóbica, geralmente aplicada na caracterização de fase reversa. A mistura foi constituída por uracila, benzonitrila, tolueno, naftaleno e benzeno. A análise dessa mistura teste, com compostos hidrofóbicos, foi importante para a determinação da modalidade que a fase Si(PGPMS) atua e a sua vazão ótima. Desta forma, foram realizados dois testes com duas composições diferentes de metanol e água. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 10.

Figura 10. Cromatogramas da separação da mistura teste hidrofóbica composta de (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno obtida pela fase Si(PGPMS). (a) FM MeOH:H₂O (60:40, v/v); (b) FM MeOH:H₂O (50:50, v/v). Vazão FM 0,4 mL min⁻¹, detecção UV 254 nm. Coluna 50 mm x 4 mm de diâmetro.



A separação da mistura hidrofóbica se mostrou eficaz como apresentado pelo cromatograma da Figura 10b, além disso observou-se que a fase Si(PGPMS) elui primeiramente um composto mais hidrofílico (uracila) e por último um composto mais hidrofóbica (naftaleno) informando que a fase estudada atua na modalidade de fase reversa. Observou-se também que aumentando a porcentagem de água na fase móvel há uma melhora na separação dos compostos da mistura pela fase Si(PGPMS). Essas análises mostram uma característica importante da fase Si(PGPMS) que é a capacidade de separar uma mistura hidrofóbica com uma maior porcentagem de água (a partir de 50 % de água na fase móvel), que é uma porcentagem de água maior que fases imobilizadas por polímeros preparadas no CroMat (DIB, 2013; CARVALHO, 2014). Por comparação, uma coluna comercial de fase reversa típica normalmente requer 80 % de solvente orgânico na fase móvel para garantir a separação destes compostos em um tempo comparável ao obtido para a fase Si(PGPMS). Essa característica pode ser atribuída ao caráter mais polar da fase estacionária devido a presença do grupo glicidóxi, reduzindo a quantidade de interações hidrofóbicas com os compostos apolares. Após determinada a melhor condição de fase móvel para a separação da mistura teste, foi realizado o estudo de vazão ótima da fase móvel para garantir a maior eficiência de análise, como indicado pela curva de Van Deemter.

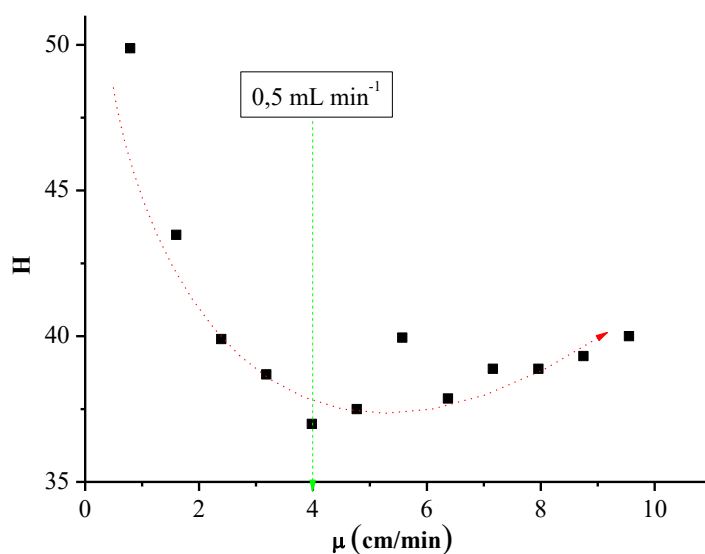
A vazão ótima da fase móvel para a separação da mistura teste pelas fases Si(PGPMS) foi determinada a partir da medida da altura de pratos (H) para o pico do naftaleno, obtida após a análise da mistura teste hidrofóbica sob diferentes vazões de FM, de 0,1 a 1,2 mL min⁻¹, sendo o valor ótimo obtido de acordo com a equação de Van Deemter, Equação 2.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad \text{Equação 2}$$

Em que: H = altura de um prato teórico, obtido pela divisão do número de pratos para o naftaleno N e o comprimento L da coluna; μ = velocidade linear (cm min⁻¹), A = efeito de caminhos múltiplos; B = coeficiente de difusão do soluto na fase móvel; C = taxa de transferência de massa do soluto na fase estacionária.

A curva de van Deemter, que relaciona a altura de um prato (H) em função da velocidade linear da fase móvel (μ) está apresentada na Figura 11.

Figura 11. Curva de van Deemter para fase estacionária Si(PGPMS), com fase móvel MeOH:H₂O (50:50, v/v), obtida da separação da mistura teste hidrofóbica. Soluto-teste: naftaleno.



O ponto mínimo da curva de van Deemter corresponde a velocidade linear da fase móvel em que a fase estacionária separa as substâncias com a maior eficiência possível. Para a fase Si(PGPMS) a vazão ótima foi de 0,5 mL min⁻¹. Essa vazão foi utilizada para os ensaios seguintes para todas as análises cromatográficas empregando a fase Si(PGPMS) dentro da coluna de 50 mm × 4 mm d.i.

4.2.2 Protocolo de Tanaka e colaboradores

O Protocolo de Tanaka e colaboradores (KIMATA *et al.*, 1989) é um método de caracterização muito utilizado por fabricantes e grupos de pesquisa acadêmicos para avaliar a qualidade e as propriedades das fases estacionárias preparadas que atuam na modalidade de fase reversa. O Protocolo de Tanaka é composto por 4 misturas em condições de análise indicadas na seção experimental. Cada mistura analisa determinadas propriedades da fase estacionária sob avaliação. As propriedades de retenção da fase Si(PGPMS), avaliadas pelo Protocolo de Tanaka, foram:

- Hidrofobicidade (k_{PB}) - Medida pelo fator de retenção do pentilbenzeno na mistura I de Tanaka. Este parâmetro indica o grau de hidrofobicidade da fase estacionária, permitindo também inferir sobre o grau de recobrimento polimérico do suporte cromatográfico;
- 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 a capacidade de uma FE em separar alquilbenzenos distintos por um grupo CH_2 ;

- Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$) - Medida pela razão dos fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$. O $\alpha_{T/O}$ mede a capacidade da FE em separar duas substâncias com polaridades similares, porém que diferem quanto à sua geometria e disposição espacial;
- Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$) - Esta propriedade é obtida pela razão dos fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/F} = k_C/k_F$. O $\alpha_{C/F}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis na FE que estão aptos a formarem ligações de hidrogênio com componentes da amostra;
- Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/F \text{ pH } 7,60}$) – Propriedade medida pela razão dos fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F \text{ pH } 7,60} = k_B/k_F$, empregando FM tamponada em pH 7,60. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da FE;
- Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/F \text{ pH } 2,70}$) – Propriedade medida pela razão dos fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,70} = k_B/k_F$, empregando FM tamponada em pH 2,70. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais presentes na FE.

Os resultados obtidos para esses parâmetros na fase Si(PGPMS) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades de retenção cromatográfica da fase Si(PGPMS) e KROMASIL C18, de acordo com as condições estabelecidas pelo Protocolo de Tanaka (indicadas na Tabela 1)..

FE	Parâmetros de retenção					
	k_{PB}	α_{CH_2}	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{C/F}$	$\alpha_{B/F \text{ pH } 7,60}$	$\alpha_{B/F \text{ pH } 2,70}$
Si(PGPMS)	1,00	1,00	1,00	0,33	3,28	1,26
*Kromasil C18 [®]	7,01	1,48	1,53	0,4	0,31	0,11

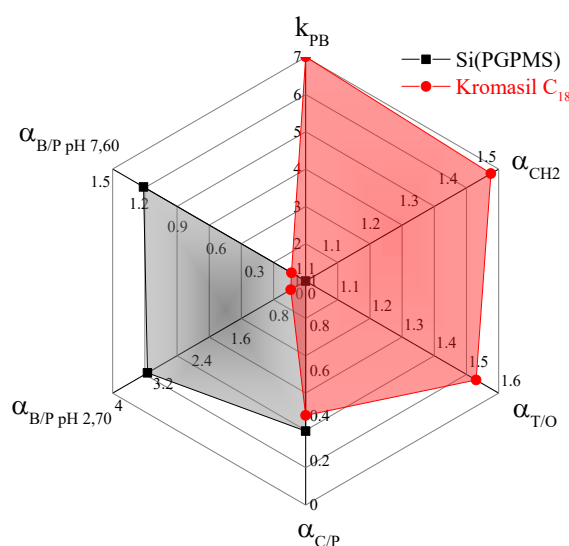
**Fonte: CRUZ et al. (1997).*

A partir dos dados da Tabela 4 foi possível perceber que os parâmetros de hidrofobicidade, seletividade hidrofóbica e seletividade estérica apresentaram valores iguais a 1,00. Esse valor indica que na condição de análise proposta pelo Protocolo de Tanaka os compostos da mistura teste 1 não foram separados pela fase Si(PGPMS). Entretanto, observou-se através dos parâmetros de capacidade de troca iônica total e capacidade de troca iônica em meio ácido que o recobrimento da sílica pelo polímero pode ser considerado eficiente, uma vez que os valores apresentados são relativamente baixos quando comparados com outras fases

imobilizadas por polímeros (DIB, 2013; CARVALHO, 2014). A capacidade de ligação de hidrogênio da fase Si(PGPMS) apresentou valores baixos, $\alpha_{C/P} < 1$, indicando um recobrimento adequado dos grupos silanóis da superfície e poros da sílica. De outra forma, estes grupos Si-OH estabeleceriam ligações de hidrogênio com a cafeína e fariam com o que valor de $\alpha_{C/P}$ fosse maior que 1.

A Figura 12 apresenta um gráfico, na forma de radar, comparando a fase Si(PGPMS) com uma fase comercial C₁₈ típica. Cada eixo do gráfico corresponde a uma das propriedades estabelecidas pelo Protocolo de Tanaka.

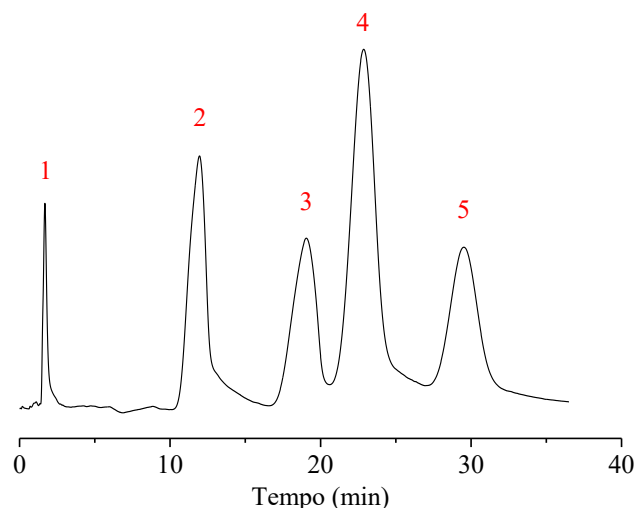
Figura 12. Gráfico radar dos parâmetros de retenção obtidos pelo protocolo de Tanaka para as fases Si(PGPMS) e Kromasil C₁₈.



De acordo com o gráfico da Figura 12 quanto maior a área hachurada maiores os valores dos parâmetros de retenção. A partir dessa informação, observa-se que a fase Si(PGPMS) possui maior interação com compostos mais polares das misturas de Tanaka, indicado pela área hachurada do lado esquerdo do gráfico, enquanto que a fase C₁₈, reconhecidamente hidrofóbica, apresenta maior área hachurada no lado direito do gráfico radar, na qual são separadas as misturas de compostos mais hidrofóbicos. Dessa forma, observa-se claramente a influência do PGPMS na fase estacionária e a maior capacidade da fase em interagir com compostos hidrofílicos. Por outro lado, a fase Si(PGPMS) apresentou baixa hidrofobicidade, indicada pelos baixos valores de k_{PB} e α_{CH2} , resultado esperado tendo em vista sua cadeia carbônica mais curta e as interações polares estabelecidas com o grupo glicidóxi. No entanto, a seletividade hidrofóbica da fase Si(PGPMS) aumentou e foi similar à da fase C₁₈ quando o teor orgânico da

fase móvel na mistura I foi reduzido de 80 para 50 %. Nessa condição foi possível separar todos os componentes da mistura I de Tanaka, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13. Cromatograma separação Mistura Tanaka I composta de (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) o-terfenila e (5) trifenileno obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:H₂O (50:50, v/v), vazão 0,5 mL min⁻¹. Coluna 50 mm x 4 mm de diâmetro.



A mistura I de Tanaka, constituída por compostos hidrofóbicos, normalmente requer uma fase móvel com maior porcentagem de solvente orgânico para que possa ser eluída mais rapidamente de uma fase estacionária reversa devido à forte interação desses compostos com a FE. No entanto, devido à polaridade associada ao PGPMS, a fase Si(PGPMS) requer maior teor de água, ou seja, menor força cromatográfica da FM para eluição de compostos hidrofóbicos. Essa característica, associada a maior interação com compostos hidrofílicos indicados pelas misturas 3 e 4 de Tanaka indicam uma seletividade diferenciada para a fase Si(PGPMS).

4.2.3 Mistura NIST SRM 870®

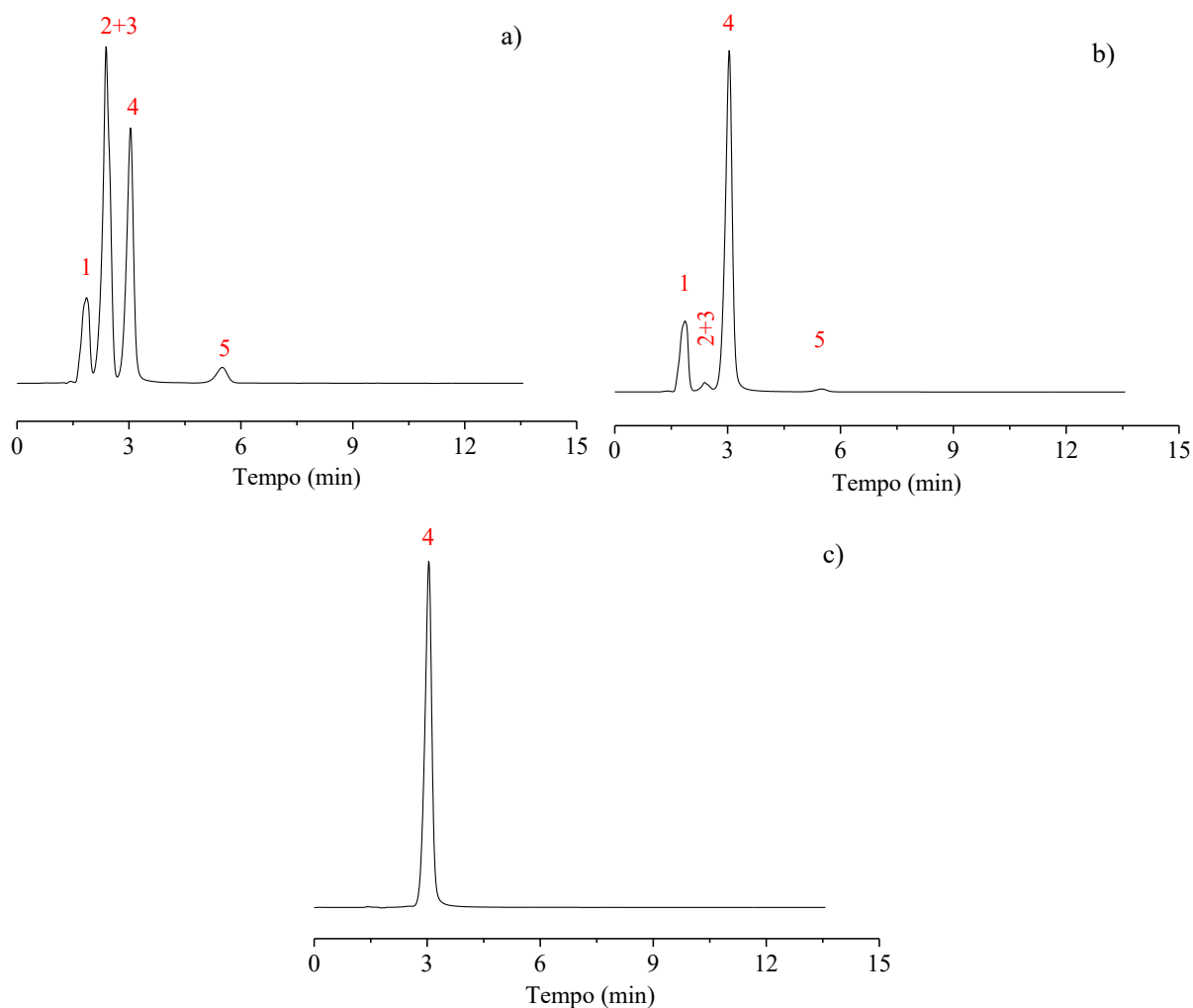
A mistura NIST SRM 870 é um protocolo de caracterização já muito utilizado por diversos grupos de pesquisas, bem como por empresas que comercializam colunas cromatográficas para HPLC. Essa mistura caracteriza a eficiência, tempo de retenção para um composto não retido, capacidade de separação e a presença de metais na coluna cromatográfica. Cada composto da mistura possui um fator de retenção que indica uma determinada propriedade da fase estacionária (NIST, 2016):

- Uracila: utiliza-se esse componente para determinar o tempo de retenção para um composto não retido na coluna cromatográfica.

- Tolueno/etilbenzeno: são marcadores comuns para calcular a eficiência da coluna.
- Quinizarina: o comportamento da retenção desse composto indica a presença ou a ausência de metais na fase estacionária, uma vez que a quinizarina é um agente quelante para cátions metálicos.
- Amitriptilina: o fator de simetria do pico da amitriptilina é um indicativo da atividade silanofílica (presença de silanóis residuais) na fase estacionária.

De acordo com o protocolo as medidas devem ser realizadas em 3 comprimentos de onda distintos para melhor analisar os componentes da mistura. Estas medidas foram realizadas em uma coluna de aço inox de 150×4 mm de d.i. Os resultados da separação da mistura SRM 870 estão apresentados na Figura 14.

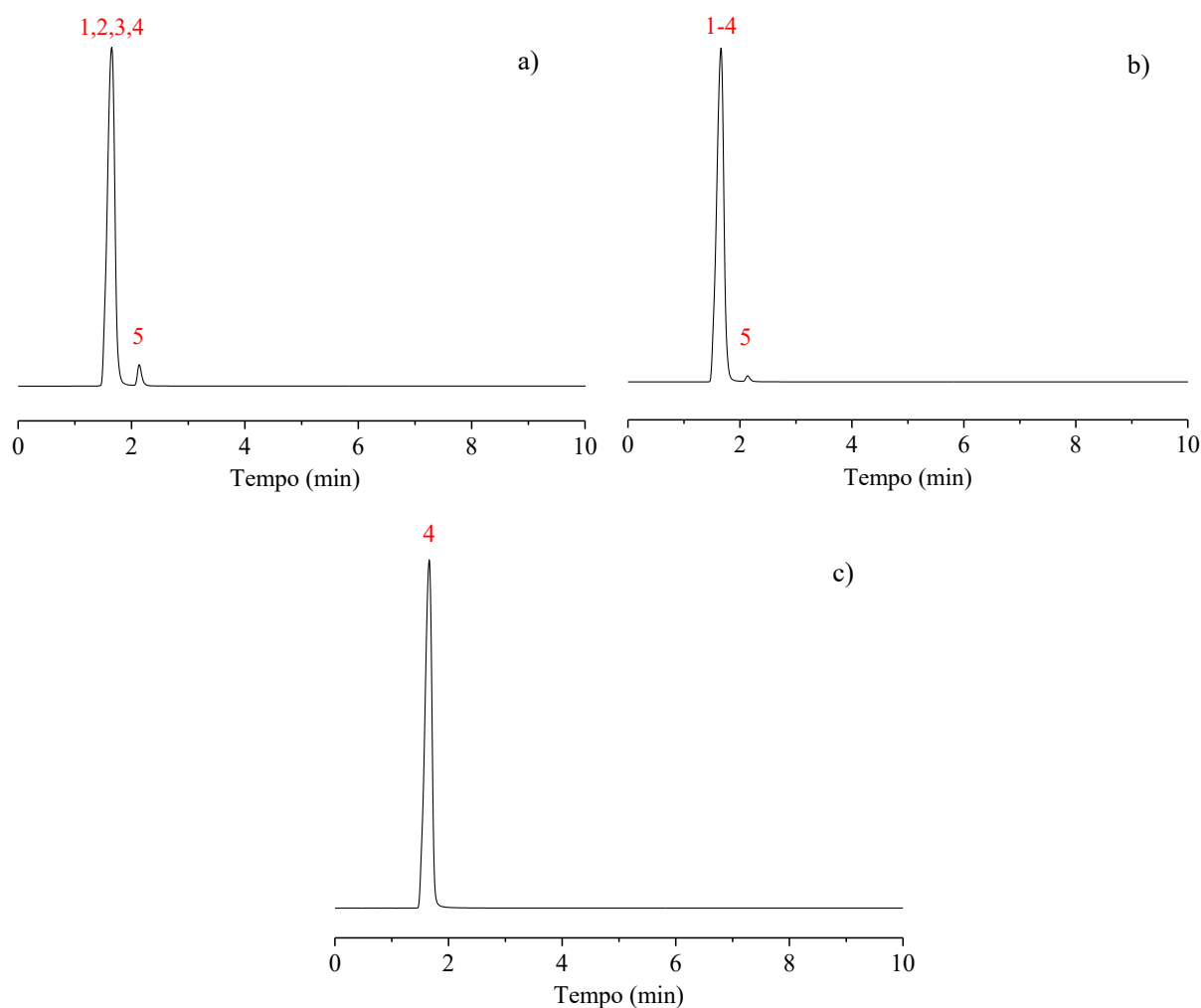
Figura 14. Cromatograma da separação mistura SRM 870 composta de (1) uracila, (2) tolueno (3) etilbenzeno, (4) quinizarina e (5) amitriptilina obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:Tampão fosfato (80:20, v/v), injeção de 20 μ L, vazão 1 mL min⁻¹. Detecção UV (a) 210 nm, (b) 254 nm e (c) 480 nm. Coluna 150 mm x 4 mm de diâmetro.



A partir da Figura 14 pode-se observar que nas análises realizadas com a mistura SMR 870, nas condições estabelecidas pelo protocolo, ocorre a separação da uracila, quinizarina e amitriptilina; porém o tolueno e o etilbenzeno são coeluídos. Esta não separação pode ser atribuída à baixa hidrofobicidade da camada de PGPMS, indicando baixa seletividade hidrofóbica da fase estacionária Si(PGPMS), corroborando com os resultados obtidos para as misturas de Tanaka.

As análises da mistura SRM 870 foram realizadas também em uma coluna comercial Cortecs, que atua no modo de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) e comercializada pela Waters. A Figura 15 apresenta os cromatogramas de separação obtidos pela fase Si(PGPMS).

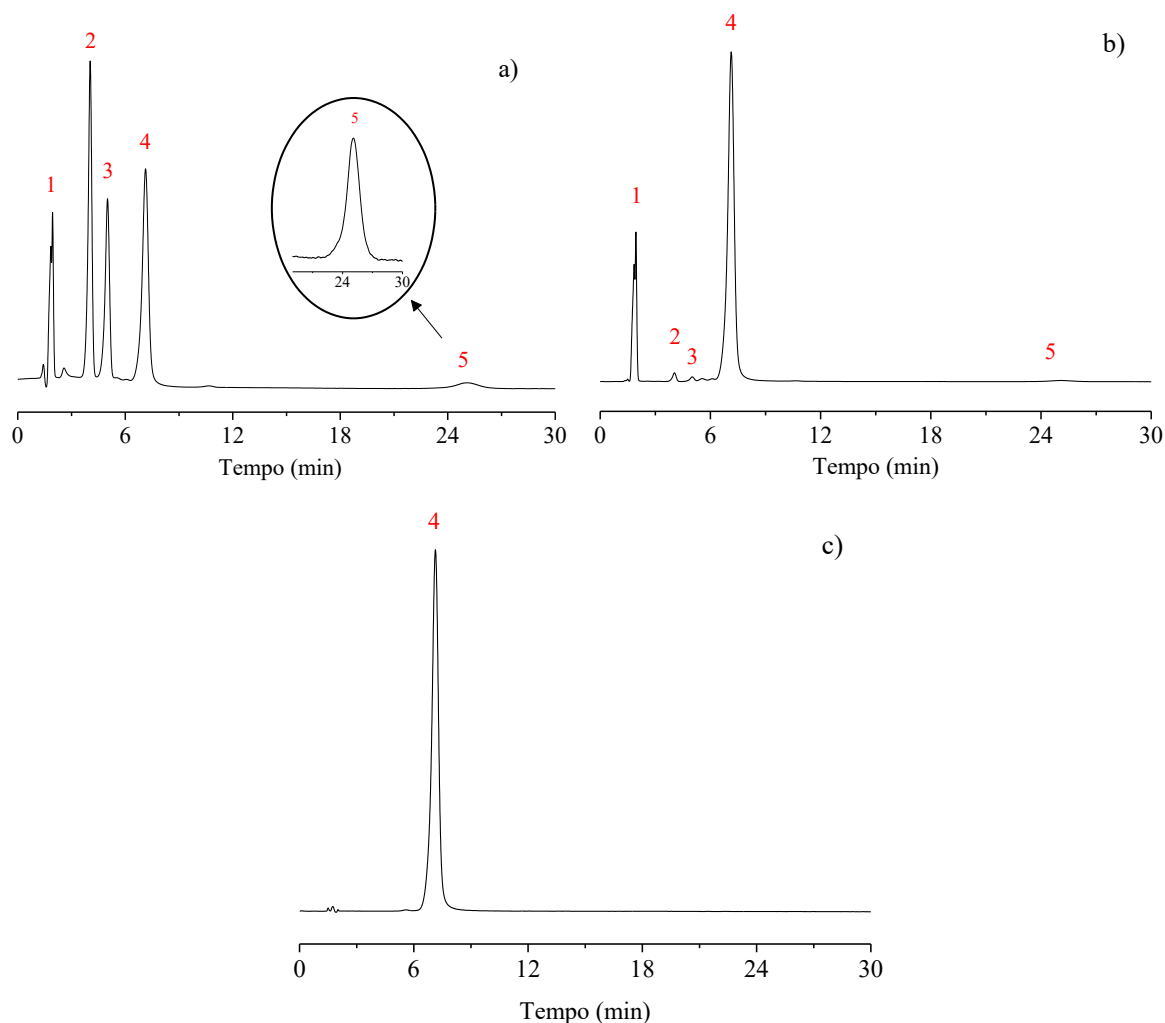
Figura 15. Cromatograma da separação da mistura SRM 870 composta de 1) uracila, 2) tolueno, 3) etilbenzeno, 4) quinizarina e 5) amitriptilina obtida pela fase Cortecs. FM MeOH:Tampão fosfato (80:20, v/v), vazão 1 mL min^{-1} . Detecção UV a) 210 nm, b) 254 nm e c) 480 nm. Coluna 150 mm x 4 mm de diâmetro.



Ao comparar os cromatogramas da Figura 15 das separações da mistura SRM 870 obtidas pela fase HILIC com aqueles obtidos pela fase Si(PGPMS) observa-se que na fase HILIC os compostos apresentaram menor capacidade de separação, coeluyendo praticamente todos os compostos. Como a mistura é empregada para caracterizar fases reversas observa-se claramente que a fase HILIC não é eficiente para tal separação. Ao mesmo tempo, é um indicativo de que a fase Si(PGPMS) atua no modo de fase reversa, apesar da menor hidrofobicidade de sua camada polimérica.

Assim como realizado para a separação da mistura I de Tanaka, foi realizada uma redução da porcentagem de solvente orgânico na fase móvel (80 para 60 %) e avaliada a capacidade de separação da mistura SRM 870 pela fase Si(PGPMS). Os resultados estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Cromatograma da separação da mistura SRM 870 composta de 1) uracila, 2) tolueno, 3) etilbenzeno, 4) quinizarina e 5) amitriptilina obtida pela fase Si(PGPMS), FM MeOH:Tampão fosfato (60:40, v/v), vazão 1 mL min⁻¹. Detecção UV a) 210 nm, b) 254 nm e c) 480 nm. Coluna 50 mm x 4 mm de diâmetro.



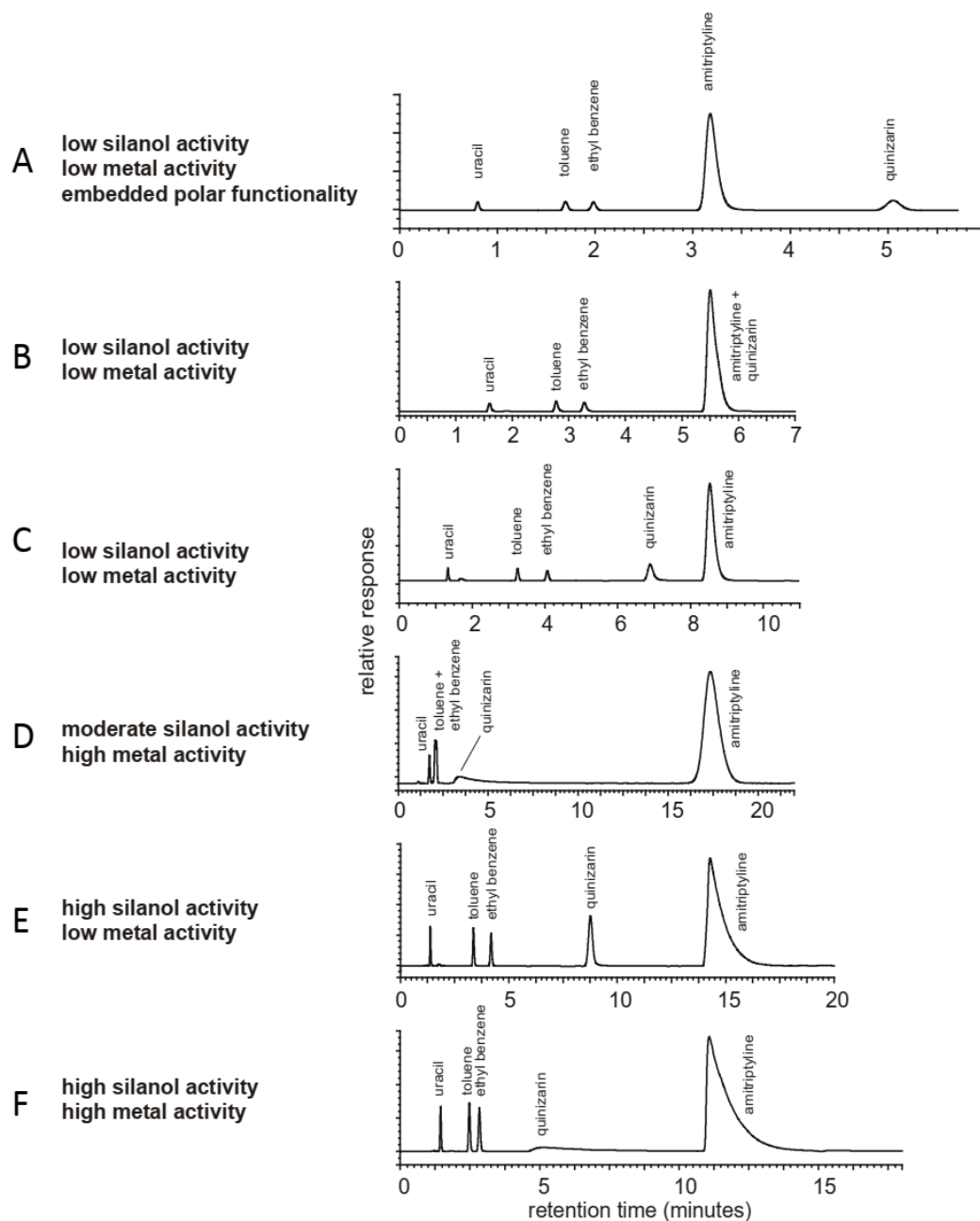
O aumento da porcentagem de água na fase móvel possibilitou a separação total dos compostos da mistura SRM 870 pela fase Si(PGPMS), corroborando com os resultados obtidos para a mistura I de Tanaka. Além da separação dos compostos, pode ser observado na Figura 16 que a eluição da quinizarina após o pico do etilbenzeno e antes do pico da amitriptilina, bem como sua eluição na forma de um pico perfeitamente simétrico são indicativos de que a fase Si(PGPMS) apresenta uma baixa atividade diante de um reagente quelante, portanto, não possui um teor significativo de cátions metálicos oriundos de sua preparação. Outro fator interessante é que a fase Si(PGPMS) se distingue de fases estacionárias com grupos polares embutidos na sua cadeia carbônica (HAN *et al.*, 2019), uma vez que a eluição da quinizarina antecede o pico da amitriptilina, fato que não ocorre com estas últimas fases estacionárias (NIST, 2016).

Outra análise a ser realizada na separação da mistura SRM 870 pela fase Si(PGPMS) é a alta eficiência alcançada pela fase estacionária, com N/m maior que 55 mil pratos m^{-1} para o pico do etilbenzeno. Essa condição pode ser observada nos cromatogramas em especial da Figura 16a em que os picos são eluídos de forma simétrica e sem alargamento. Com relação a atividade silanofílica da fase Si(PGPMS), ou seja, a presença de grupos ativos residuais que permaneceram na fase estacionária após a imobilização do polímero, pode-se inferir que seja efetivamente baixa, uma vez que o pico da quinizarina foi eluído de forma simétrica e caso houvesse grupos silanóis residuais em profusão o pico apresentaria uma cauda intensa no cromatograma. No entanto, deve-se ressaltar o longo tempo de retenção para a amitriptilina que é um indicativo de interações hidrofílicas realizadas com a fase estacionária e que, portanto, devem ter acontecido com o grupamento glicidóxi do PGPMS. Essa propriedade retentiva da fase estacionária a capacita para separações envolvendo misturas de compostos polares, pois oferece uma retentividade diferenciada para substâncias mais polares, superior àquelas alcançadas por fases reversas tradicionais, porém sem alargamento de pico ou interação residual e com a vantagem de empregar quantidades maiores de água na composição da fase móvel.

O protocolo proposto pela NIST sugere ainda fazer a comparação do perfil de separação da mistura SRM 870® obtido pela fase estacionária em caracterização com os perfis normalmente encontrados para fases reversas convencionais, apresentados na Figura 17. De acordo com estes perfis, observa-se que a fase Si(PGPMS) apresenta comportamento mais próximo ao cromatograma C da figura, em que todos os picos são eluídos na mesma ordem e de forma simétrica, indicando baixas atividades silanofílica e quelante. No entanto, as interações hidrofílicas entre a amitriptilina e a camada de PGPMS sugeridas nesse trabalho, levam a uma

maior retenção desse composto na fase estacionária, bem como a necessidade de maior quantidade de água para resolver os picos dos compostos polares da mistura.

Figura 17. Exemplos de separações da mistura SRM 870® por colunas comerciais recheadas com fases C_{18} .

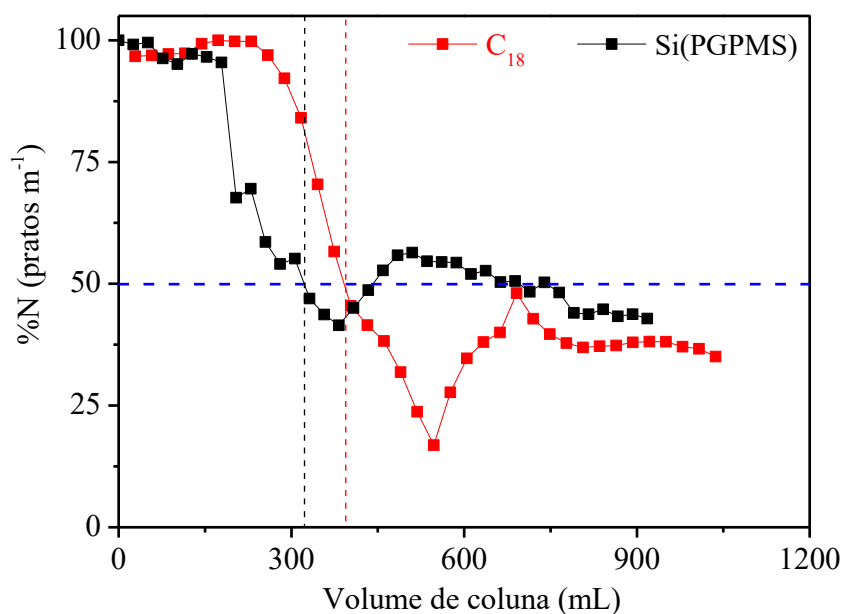


Fonte: Ilustração extraída da referência NIST (2016)

4.3 Avaliação da estabilidade química da fase Si(PGPMS)

Além das análises de protocolos e de misturas reais para a caracterização cromatográfica da fase Si(PGPMS), avaliou-se a vida útil da fase estacionária Si(PGPMS) utilizando a mistura padrão hidrofóbica através da passagem contínua de fase móvel altamente degradante (alcalina, sob alta temperatura e concentração elevada de tampão inorgânico), empregando o teste proposto por GOMES *et al.* (2020). A Figura 18 apresenta o gráfico dos resultados obtidos da degradação da fase Si(PGPMS) em comparação com a degradação de uma fase estacionária comercial C₁₈ tipicamente empregada em separações.

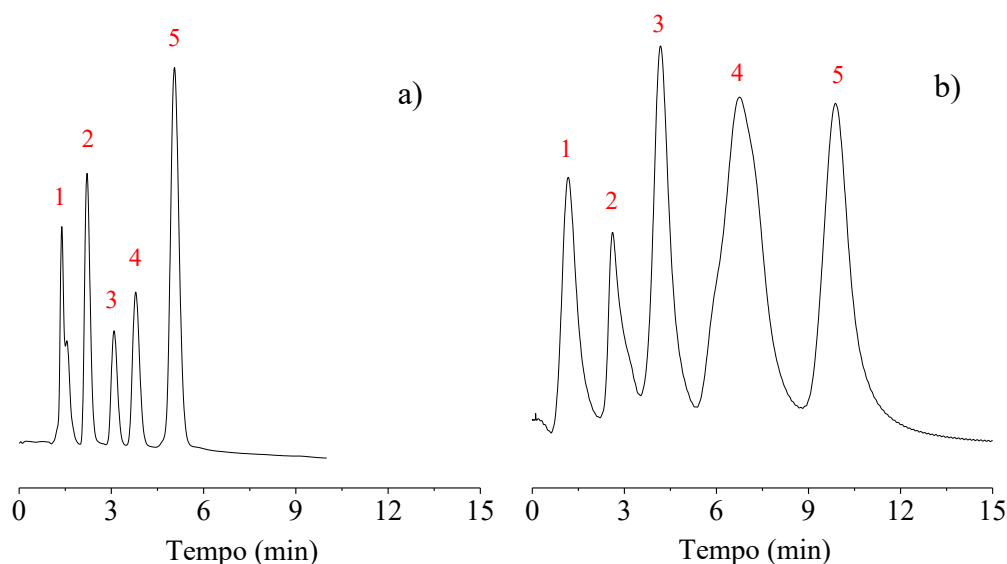
Figura 18. Estudo da degradação da fase estacionária Si(PGPMS) e a fase estacionária C₁₈.



O limite da vida útil de uma coluna cromatográfica é definido quando em um teste de degradação rápida a perda de sua eficiência chega a 50 % do seu valor de partida, que normalmente é representada por uma queda brusca no gráfico que relaciona a porcentagem de eficiência em função do volume de fase móvel eluído (FONSECA *et al.*, 2004). Sendo assim, de acordo com a Figura 18 observou-se que a morte da coluna para fase Si(PGPMS) ocorre quando se atinge 320 volumes de coluna e a morte da fase comercial, quimicamente ligada, ocorre ao atingir 390 volumes de coluna. Ao comparar a morte das duas fases estudadas percebeu-se que ambas possuem uma degradação de fase próximas, porém mostrando que a fase Si(PGPMS) possui vida útil ligeiramente inferior à fase comercial. Considerando a simplicidade e o baixo custo de preparação da fase Si(PGPMS) essa diferença de estabilidade pode ser considerada negligenciável.

Além disso, a Figura 19 apresenta os cromatogramas antes e após o teste de estabilidade da mistura padrão, em que se observa que apesar da morte da fase Si(PGPMS), registrada pela queda brusca de eficiência de coluna e refletida nos alargamentos dos picos, a capacidade de separação dos compostos da mistura padrão foi mantida. É observado um aumento no tempo de retenção dos compostos, provavelmente devido a manutenção de camadas poliméricas dentro da coluna, mesmo com a dissolução de parte do suporte de sílica. Como verificado no espectro de ^{29}Si NMR, o PGPMS forma ligação química com a superfície da sílica, o que pode ter assegurado essa sobrevida para a separação de substâncias mesmo após a degradação da fase estacionária.

Figura 19. Cromatogramas da separação da mistura teste composta de 1) uracila, 2) benzonitrila, 3) benzeno, 4) tolueno e 5) naftaleno obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:H₂O (60:40, v/v). Vazão FM 0,5 mL min⁻¹, detecção UV 254. nm. a) Antes do teste e b) após o teste de estabilidade. Coluna 50 mm x 4 mm de diâmetro.



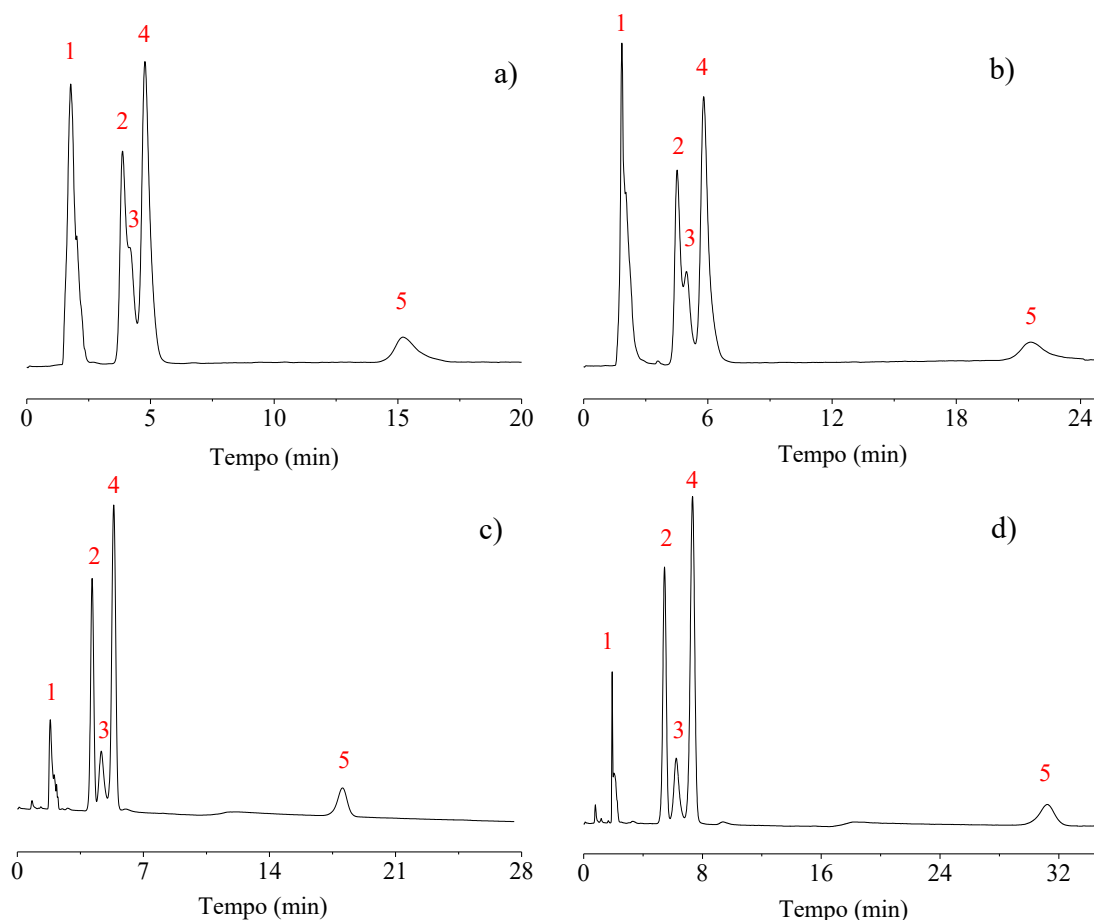
4.4 Avaliação da aplicabilidade da fase Si(PGPMS)

Diante das características de retenção da fase Si(PGPMS) misturas de compostos polares foram analisadas para avaliar a potencialidade de aplicação do material. As misturas são constituídas de compostos padrão, que normalmente apresentam dificuldade de separação em colunas comerciais a base de C₁₈.

4.4.1 Separação de compostos polares pequenos

Além das análises de protocolos para caracterizar a fase estacionária recheando a coluna cromatográfica, foram realizadas também análises da aplicabilidade da fase Si(PGPMS) em uma segunda mistura teste preparada em nosso laboratório constituída de compostos polares pequenos. A mistura hidrofílica, mistura teste 2, consistiu-se de 5 compostos: uracila, benzonitrila, fenol, benzilamina e tolueno, que foram escolhidos por apresentarem características polares, exceto o tolueno que foi escolhido para confirmar a eluição dos compostos no modo de fase reversa. A Figura 20 apresenta os cromatogramas obtidos na separação da mistura hidrofílica utilizando diferentes composições de fase móvel constituída de acetonitrila e água.

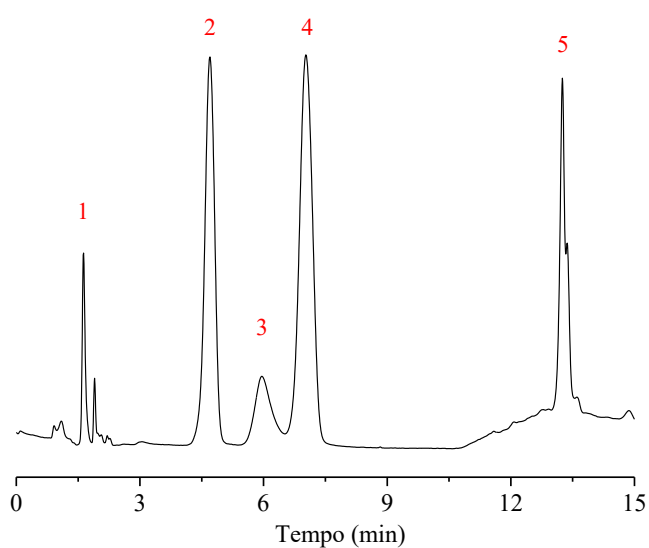
Figura 20. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila, (5) tolueno obtida pela fase Si(PGPMS). FM ACN:H₂O (a) (40:60, v/v), (b) (30:70, v/v); (c) (20:80, v/v); (d) (10:90, v/v). Detecção UV 254 nm. Vazão 1,0 ml min⁻¹. Coluna 150 mm x 4 mm de diâmetro.



A partir da Figura 20 observou-se o cromatograma da condição ACN:H₂O (10:90, v/v) (Figura 20d) apresenta uma melhor separação dos compostos da mistura hidrofílica, tendo em vista que houve a identificação de cada pico correspondente a cada componente da mistura. Além disso, inferiu-se que ao aumentar a porcentagem de água na fase móvel há uma melhora na separação dos compostos da mistura pela fase Si(PGPMS), reforçando a característica da fase preparada em separar misturas com alta porcentagem de água. Contudo, a separação da mistura hidrofílica possui um alto tempo de análise (entre 25 e 30 minutos), isso ocorre devido ao tolueno possuir um maior tempo de retenção por ser um composto hidrofóbico.

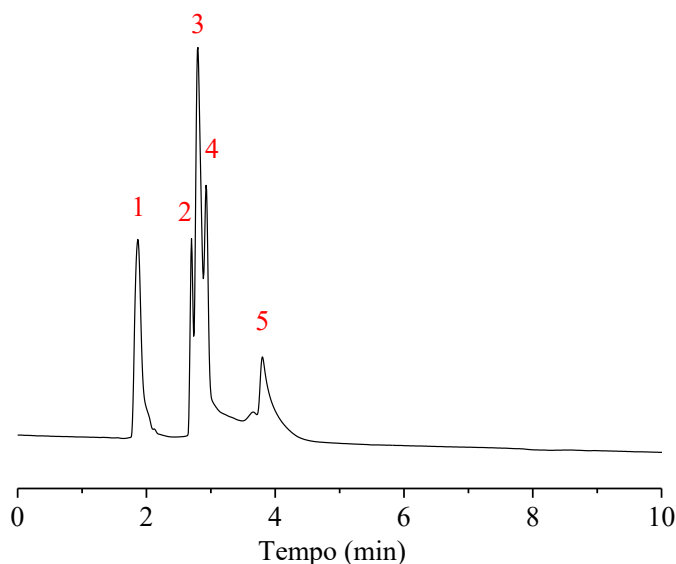
Devido ao elevado tempo de análise alcançado na separação da mistura 2, foi proposta a utilização de um gradiente de eluição, obtendo uma separação satisfatória em um menor tempo de análise. A apresenta o cromatograma da separação da mistura de compostos polares na fase Si(PGPMS) obtido a partir da condição de gradiente de fase móvel. Este cromatograma apresenta uma separação mais rápida, em até 15 minutos da mistura, e indica a resistência da fase Si(PGPMS) em suportar gradientes de eluição, normalmente não adequados para fases estacionárias imobilizadas por polímeros. Essa resistência pode estar associada a ligação química do PGPMS aos silanóis da superfície da sílica registrada no espectro de ²⁹Si NMR da fase Si(PGPMS).

Figura 21. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila e (5) tolueno obtida pela fase Si(PGPMS). FM ACN:H₂O (10:90, v/v) 0-7 min e ACN:H₂O (50:50,v/v) de 7-15 min. Detecção UV 254 nm. Vazão 1,0 mL min⁻¹. Coluna 150 mm x 4 mm de diâmetro.



A mistura teste 2 de compostos polares pequenos foi analisada também por uma fase estacionária comercial HILIC, Cortecs da Waters. A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido sob as mesmas condições empregadas para a fase Si(PGPMS).

Figura 22. Cromatograma da separação da mistura teste 2 composta por (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina, (4) benzonitrila, (5) tolueno obtida pela fase Cortecs. FM ACN:H₂O (10:90, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão 1,0 mL min⁻¹. Coluna 150 mm x 4 mm de diâmetro.



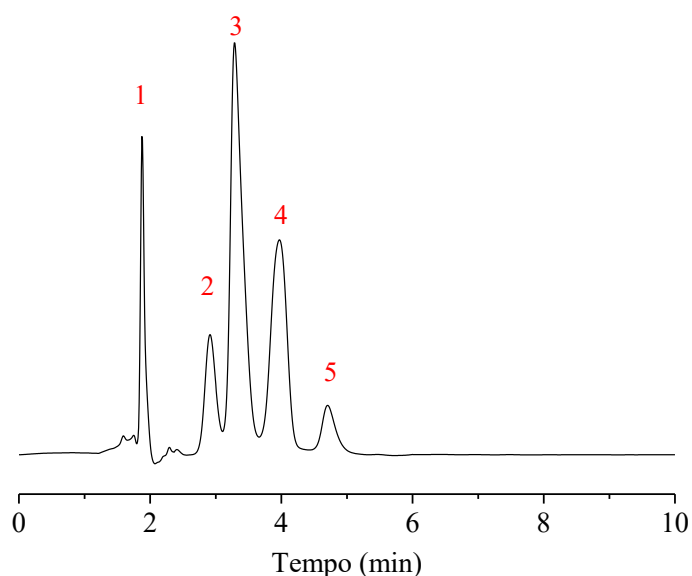
Ao comparar o cromatograma da Figura 20d com o da Figura 22 observa-se que a separação da mistura hidrofílica pela fase Si(PGPMS) apresentou uma maior eficiência na separação dos compostos na condição de fase móvel ACN:H₂O (10:90,v/v) em relação à fase HILIC. Este resultado comprova que a fase Si(PGPMS) possui uma seletividade hidrofílica para separação de compostos polares pequenos, garantindo a retenção de compostos hidrofóbicos sempre no modo de fase reversa, além de possibilitar a eluição por gradiente.

4.4.2 Separação de fármacos básicos e sulfacompostos

A aplicabilidade da fase Si(PGPMS) foi avaliada também a partir da análise de uma mistura de fármacos preparada em laboratório, a partir de padrões secundários obtidos nas redes de farmácias de manipulação da cidade de Ituiutaba/MG. A mistura de fármacos consistiu de 5 compostos: cimetidina, furosemide, hidroclorotiazina, ranitidina e sulfazalazina, que foram escolhidos de acordo com sua ampla utilização e, em particular, por apresentarem características polares que torna-os difíceis de serem analisados nas colunas comerciais tradicionais a base de C₁₈, tendo em vista que os fármacos escolhidos se referem à sulfa compostos que possuem forte

retenção nas fases comerciais estacionárias comerciais, devido a interações indesejáveis com o suporte cromatográfico, resultando em separações pouco eficientes, com picos muito largos e tempos de análises relativamente longos (HSU *et.al.*, 2011). A Figura 23 apresenta o cromatograma da melhor condição de separação da mistura dos fármacos obtida pela fase Si(PGPMS). Na condição de fase móvel utilizou-se o acetato de amônio devido ele apresentar uma interação diferente com os grupos aminas, hidroxilas, oxigênio presentes nos compostos da mistura de fármacos.

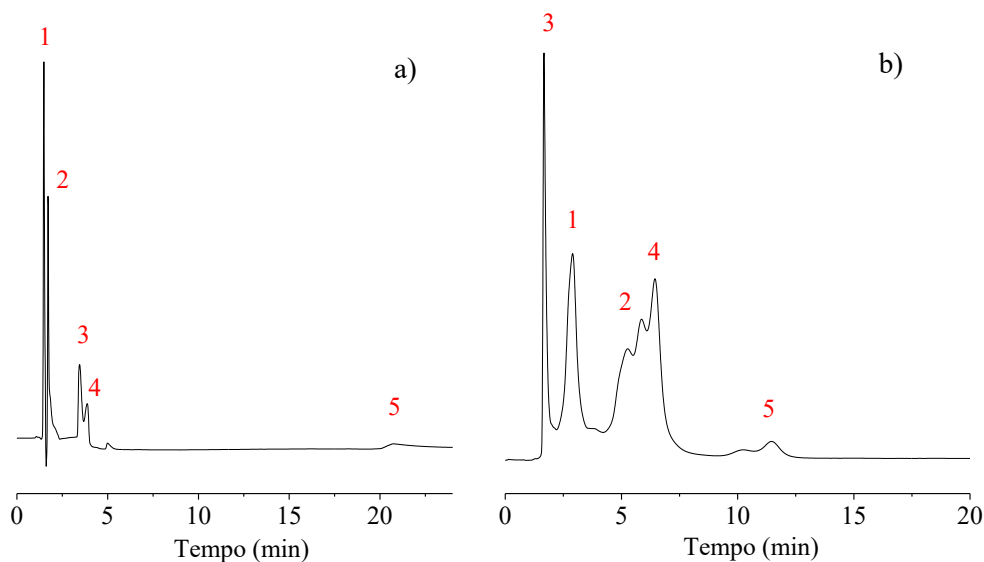
Figura 23. Cromatograma da separação da mistura de fármacos composta por (1) hidroclorotiazida, (2) furosemida, (3) sulfassalazina, (4) cimetidina e (5) ranitidina obtida pela fase Si(PGPMS). FM MeOH:solução acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 (5:95, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão 0,5 mL min⁻¹. Coluna 50 mm x 4 mm de diâmetro.



A partir da Figura 23 observou-se que a separação dos compostos da mistura de fármacos somente é possível se a porcentagem de água na análise for maior que 90 %, mostrando que a fase Si(PGPMS) é mais eficiente na separação ao se utilizar altas porcentagens de água. Além disso, percebeu-se que todos os compostos da mistura foram separados totalmente e eficientemente em um período curto de análise, cerca de 5 minutos.

As análises da mistura de fármacos foram realizadas também em duas fases estacionárias comerciais, empregando a coluna X-Select C₁₈, que apresenta alta estabilidade química, e a Cortecs, que é a melhor coluna que atua no modo HILIC, para se obter uma comparação da separação dos compostos destas fases com a fase Si(PGPMS). A Figura 24 apresenta os cromatogramas obtidos pela separação dos fármacos nas colunas comerciais nas mesmas condições de análise empregadas para a fase Si(PGPMS).

Figura 24. Cromatograma da separação da mistura de fármacos composta por (1) hidroclorotiazida, (2) furosemida, (3) sulfasalazina, (4) cimetidina e (5) ranitidina obtido pela fase (a) C_{18} X-Select e (b) HILIC Cortecs. FM MeOH:solução acetato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (5:95, v/v), detecção UV 254 nm. Vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna $50 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ de diâmetro.



A partir dos cromatogramas apresentados na Figura 24 observou-se que as fases comerciais (X-Select e Cortecs), nas condições de análise empregadas, não apresentaram picos definidos para os fármacos e nem mesmo uma separação satisfatória dos compostos. Enquanto na fase Si(PGPMS) a separação ocorreu em um tempo de análise curto e de forma eficiente, quando a fase móvel empregada foi altamente aquosa. Contudo, ao comparar as ordens de eluição nos cromatogramas observou-se que houve uma mudança na ordem de eluição dos compostos na coluna Cortecs. Essa mudança foi causada pela diferença de modalidades das fases estudadas, a fase Si(PGPMS) e a X-Select atuam na modalidade de fase reversa, enquanto a coluna Cortecs atua no modo HILIC, esse modo mostra uma ordem de eluição similar ao modo de fase normal, causando a alteração observada na ordem de eluição.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados físico-químicos obtidos conclui-se que a sílica da fase Si(PGPMS) tem um eficiente recobrimento pelo polímero, devido à presença do grupo glicidil em sua estrutura monomérica, de alto desempenho, com rápida taxa de transferência de massa de soluto. Observa-se através das análises das misturas testes padrão que a fase Si(PGPMS) possui um melhor desempenho quando a fase móvel é composta de uma alta porcentagem de água. Essa característica pode estar relacionada com a seletividade da fase Si(PGPMS) que estabelece mais interações hidrofílicas com os compostos a partir do grupo glicidóxi na estrutura monomérica. Através dessas mesmas misturas percebe-se que a fase Si(PGPMS) realiza uma interação com compostos polares utilizando uma baixa porcentagem do solvente orgânico, o que torna por si só um processo vantajoso, haja vista que gerará um menor volume de resíduos de solventes orgânicos pós-análises cromatográficas.

A partir das misturas NIST SRM 870 e do Protocolo de Tanaka e colaboradores observa-se que a separação da mistura é eficiente nas condições estabelecidas pelo protocolo, porém ao aumentar a porcentagem de água na análise conclui-se que há uma melhora na separação, nem sempre acompanhada de uma melhora na eficiência de coluna. A mistura dos fármacos e a mistura hidrofílica também foram mais eficientemente separadas com maiores porcentagens de água na fase móvel, acima de 90 %, confirmando que a fase estacionária Si(PGPMS) possui atuação no modo denominado *per-aqueous liquid chromatography* ou cromatografia líquida em fase aquosa.

Segundo as análises realizadas pela fase Si(PGPMS) em relação as fases comerciais C₁₈ e HILIC observa-se que a separações das misturas NIST SRM 870, hidrofílica e a dos fármacos é melhor e mais eficiente na fase Si(PGPMS), mostrando seu potencial para este tipo de análise. A estabilidade da fase Si(PGPMS) se mostrou ligeiramente inferior a fase estacionária quimicamente ligada comercial, porém devido ao baixo custo e a simplicidade de preparação essa diferença em termos de estabilidade química da fase estacionária pode ser considerada pequena ao final do processo.

De uma forma geral, conclui-se, portanto, que a fase Si(PGPMS) apresenta características hidrofílicas em sua cadeia polimérica que lhe possibilita a separação eficiente de compostos polares empregando uma baixa quantidade de solvente orgânico na fase móvel, alcançando assim o objetivo principal desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- BACHMANN, S.; MELO, L. F. C.; SILVA, R. B.; ANAZAWA, T. A.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H.; ALBERT, K. Synthesis and Solid-State NMR Investigations of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silicas. *Chemistry of Materials*, v. 13, p. 1874-1879, 2001. DOI: 10.1021/cm001179f.
- BOTTOLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 1030, p. 217-223, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.107.
- CARVALHO, G. O. Preparação e caracterização de fase estacionária baseada na imobilização micro-ondas do poli(dimetil-*co*-alquimetilsiloxano) sobre sílica para CLAE-FR. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Química), Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG, 2014.
- CARVALHO, G. O.; SILVA, C. G. A.; FARIA, A. M. A New stationary phase for analysis of hydrophobic compounds by RP-LC. *Chromatographia*, v. 79, p. 19-27, 2016. DOI: 10.1007/s10337-015-2993-9.
- CARVALHO, G. O. Desenvolvimento de Fases Estacionárias Baseadas em Poli(Óxido de Etileno-*co*-Dimetilsiloxano) Imobilizado Termicamente Sobre Sílica para Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2017.
- CHAUDHRY, Z. F. Novas fases estacionárias para CLAE preparadas por imobilização térmica de PMODS sobre diferentes suportes de sílica. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2005.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. 2ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, p. 452, 2006.
- COLLINS, C. H. Michael Tswett e o "nascimento" da cromatografia. *Scientia Chromatographica*, v. 1, p. 7-20, 2009.
- 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. DOI: 10.1007/BF02466449.
- DIAS, I. L. T.; NET. G. O.; MARTINS, J. L. S. Metodologias analíticas para a determinação da furosemida. *Lecta*, v. 22, n. 1-2, p. 19-26, 2004.
- DIB, S. Desenvolvimento de uma fase estacionária baseada na imobilização térmica de poli(etilenimina) sobre sílica, capeada com grupos C₁₈, para CLAE-FR. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Química), Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG, 2013.
- 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. DOI: 10.1007/s10337-014-2649-1.

ENGELHARDT, H.; BLAY, Ch.; SAAR, J. Reversed phase chromatography - the mystery of surface silanols. *Chromatographia*, v. 62, n. 13S, p. S19-S29, 2005. DOI: 10.1365/s10337-005-0573-0.

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

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 (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 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. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1385-1398, 2009. DOI: 10.1590/S0103-50532009000800002.

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

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

GOMES, K. A.; SANTOS, A. L. R.; FARIA, A. M. Avaliação de aditivos de fase móvel e temperatura na vida útil de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 43, p. 300-306, 2020. DOI: 10.21577/0100-4042.20170482.

GRANT, S. M.; LANGTRY, H. D.; BROGDEN, R. N. Ranitidine: An update review of its pharmacokinetics and pharmacodynamics properties and therapeutics use in peptic ulcer disease and other allied disease. *Drugs*, v. 37, p. 801-870, 1989. DOI: 10.2165/00003495-198937060-00003.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. Adsorption, Surface Area and Porosity. 2ªed. London: Academic Press, p. 303, 1982.

HAN, H.; ZHANG, Y.; LU, R.; ZHANG, M. An alternative approach for preparation of amide-embedded stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1593, p. 24-33, 2019. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.01.054.

HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. 8ª ed. New York: W. H. FREEMAN AND COMPANY, p. 638, 2010.

HSUA, J. J.; HUANG, I.; HWANG, C.; WU, M. C. Rapid chromatographic separation of sulfa drugs by udes molecularly imprinted polymer. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 18, p. 7-12, 2011.

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. *Journal of Chromatographic Science*, v. 27, p. 721-728, 1989. DOI: 10.1093/chromsci/27.12.721.

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

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. R. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 3, p. 435-446, 2007. DOI: 10.1590/S1516-93322007000300012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. A new thermally immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 174-181, 2010. DOI: 10.1002/jssc.200900574.

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

NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 2, p. 111-135, 2013. DOI: 10.4322/sc.2013.009.

NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; CARR, W. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 1-30, 2004. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.052.

NIST - NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY. Certificate of Analysis. Standard Reference Material® 870, Column Performance Test Mixture for Liquid Chromatography. Gaithersburg, 2016.

PESEK, J. J.; SANDOVAL, J. E.; SU, M. New alumina-based stationary phases for high-performance liquid chromatography: Synthesis by olefin hydrosilation on a silicon hydride-modified alumina intermediate. *Journal of Chromatography A*, v. 630, p. 95-103, 1993. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80444-D.

PLOSKER, G. L.; CROOM, K. F. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs*, v. 65, p. 1825-1849, 2005. DOI: 10.2165/00003495-200565130-00008.

SANTOS, A. L. R. Preparação, otimização e caracterização de uma fase estacionária obtida pela imobilização térmica de poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) em partículas de sílica aluminizada. Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Química), Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG, 2016.

SANTOS, A. L. R. Poli(óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) termicamente imobilizado sobre sílica aluminizada como fase estacionária seletiva e estável para CLAE. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia. Ituiutaba, MG, 2019.

SAMPAIO, B. C.; FEDER, D.; OLIVEIRA, M. T. C.; HAMAOU, A. Cimetidina, *Arquivos Médicos ABC*, v. 2, p. 17-19, 1979.

SEGATO, M. P. Preparo, caracterização e aplicação de fases estacionárias de poli(dimetilsiloxano-co-metilsiloxano) sorvidas e imobilizadas sobre sílica e sílica zirconizada. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2011.

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

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C.S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000400017.

VIGNA, C. R. M. Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2004.

ZHANG, Y.; ZHONG, H.; CAO, Z.; ZHOU, S.; ZHANG, D.; LU, .; HAN, H.; ZHANG, M.; QIU, H. Design and evaluation of polar-embedded stationary phases containing triacontyl group for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1621, p. 461035, 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461035.

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. *Colloids and Surfaces A*, v. 173, p. 1-38, 2000. DOI: 10.1016/S0927-7757(00)00556-2.