

**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**TESE DE DOUTORADO**

**“Síntese e Caracterização de Nova Fase Monolítica para  
Eletrocromatografia Capilar Usando Método Sol-Gel”**

**ALUNA: María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli**

**Campinas 2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

P773s Ponce, María de Jesús Santa Gutiérrez.  
Síntese e caracterização de nova fase monolítica  
para eletrocromatografia capilar usando método sol-gel /  
Maria de Jesús Santa Gutiérrez Ponce. -- Campinas, SP:  
[s.n], 2011.

Orientador: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Agente sililante. 2. Monolito. 3. Sílica.  
4. Eletrocromatografia capilar. I. Bottoli, Carla Beatriz  
Grespan. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Synthesis and characterization of a new monolithic phase for capillary electrochromatography by sol-gel method

**Palavras-chaves em inglês:** Silylating agent, Monolithic, Sílica, Capillary electrochromatography

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (orientadora), Dra. Lúcia Maria Laboissière de Alencar Auler (CDTN-MG), Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho (DQ-UFSM), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 15/07/2011



*A Deus pelo dom da vida.*

*Senhor eu te amo, espero e confio,  
peço perdão pelas vezes que  
não te ameí, não esperei e não confiei.*

*Que este trabalho seja para a glória de Deus.*



*À minha família mexicana*

*aos amigos internacionais*

*e à minha família brasileira*

*Dedico esta tese*



## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, gostaria de agradecer às professoras que ajudaram a voltar ao Brasil, professora Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim e professora Dra. Susanne Rath. Também agradeço a quem aconselhou e ajudou para iniciar o doutorado, professor Dr. Celso Aparecido Bertran.*

*Intensamente, gostaria de agradecer à professora Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli, pela confiança, ajuda e orientação.*

*Aos professores, aos colegas e as técnicas dos grupos de pesquisa GEM e LabCROM, pela ajuda nas diversas etapas do presente trabalho.*

*Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e ao Instituto de Química e a UNICAMP pelo apoio acadêmico.*



## RESUMO

Monolitos à base de sílica têm sido usados como fases estacionárias em eletrocromatografia capilar e apresentam vantagens em relação aos materiais particulados tais como: melhor homogeneidade; controle do tamanho dos poros; alta estabilidade mecânica e térmica; minimização da formação de bolhas e diminuição de problemas com filtros.

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de uma nova fase estacionária monolítica à base de sílica com grupos carboxílicos em sua estrutura, os quais ajudam a sustentar o fluxo eletrosmótico e conferem características de troca catiônica à fase.

A fase estacionária monolítica foi sintetizada empregando o processo sol-gel. A síntese do agente sililante foi feita a partir de ácido 4-aminobenzóico e trietóxi-propil-silano. A derivatização da fase estacionária monolítica foi feita adicionando-se ao monolito uma solução de 10% do silano em DMF e deixando reagir por 6 horas a 60 °C.

A fase estacionária monolítica funcionalizada foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho e análise elementar. A fase estacionária também foi testada com um equipamento de eletroforese capilar construído no laboratório com detecção condutométrica sem contato ( $C^4D$ ) e um equipamento de eletroforese capilar Agilent com detecção UV.

Os resultados da microscopia eletrônica confirmaram a formação do monolito dentro do capilar e a espectroscopia no infravermelho, bem como a análise elementar permitiram caracterizar tanto o monolito como o silano empregado na funcionalização do monolito. Na avaliação com detector  $C^4D$  foram separados cátions e aminoácidos, evidenciando a característica de troca catiônica da fase. Na avaliação com detector UV foi confirmada a falta de seletividade da fase para compostos apolares, mas, foram separados alguns fármacos básicos com boa resolução e formato de pico o que indica a possibilidade de aplicação da nova fase em separações de compostos básicos.



## ABSTRACT

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A NEW MONOLITHIC PHASE FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY BY THE SOL-GEL METHOD.

Monoliths are used as stationary phases in capillary electrochromatography since they can effectively overcome the difficulties associated with packed capillary column technology. A remarkable advantage of monolithic columns is the elimination of the end frits required to retain particulate stationary phases.

The aim of the present study was to synthesize and characterize a new silica-based monolithic stationary phase with carboxylic groups in its structure, which help to support the electroosmotic flow and confer characteristics of cation-exchange to the phase.

The formation of the monolith inside the capillary was achieved using the sol-gel method. The silylant agent was made from 3-(triethoxysilyl)propylisocyanate and 4-aminobenzoic acid. The surface modification of the monolith with the silylant agent used a 10% solution in DMF, left to react for 6 h at 60 °C.

The modified monolithic column was evaluated by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and elemental analysis. The column was tested using a homemade capillary electrophoresis system with a capacitively coupled contactless conductivity detector (C<sup>4</sup>D) and with Agilent capillary electrophoresis equipment with UV detection.

The results of scanning electron microscopy confirmed the formation of the monolith while infrared spectroscopy and elemental analysis characterized the synthesized silylant agent used in the modification of the monolithic column as well as the modified monolith. In evaluations with the C<sup>4</sup>D cations and amino acids were separated, showing the characteristics of a cation-exchange phase. With UV detection the lack of phase selectivity for apolar compounds was confirmed, but some basic drugs were separated with good resolution and peak shape, which indicates the possibility of applying the new phase in separations of basic compounds.



## CURRÍCULO

---

### 1. Dados pessoais

---

Nome: María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce

Nome em citações bibliográficas: Gutiérrez-Ponce, M. J. S.

Sexo: Feminino

Endereço profissional: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

Cidade Universitária - Barão Geraldo, 13084-755 - Campinas, SP - Brasil - Caixa-Postal: 6154

Endereço eletrônico: marepg@yahoo.com.br

---

### 2. Formação Acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

---

1999-2001: Mestrado em Química Analítica.

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Título: “Determinação cinética de cianeto livre pelo monitoramento espectrofotométrico da reação de *o*-dinitrobenzeno com *p*-nitrobenzaldeído”.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, no programa PEC-PG Brasil-México.

Palavras-chave: cianeto livre, métodos cinéticos de análise.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Química

Analítica / Especialidade: Métodos cinéticos de análise.

1992–1996: Graduação em Química.

*Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, México, D.F..*

Título obtido em 1998 com a monografia: “*Interacción de los iones Ca (II) y Pb (II) con el dipéptido GliGlu*”

Orientadora: Profa. Dra. Laura Gasque Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Moreno Esparza

Bolsista do: *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, México.*

---

### 3. Produção científica

---

#### 3.1. Resumo do trabalho científico apresentado em congresso

- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Rossi, A.V.; Tubino, M.; “Otimização de Método Cinético para Determinação de Cianeto com Medidas Espectrofotométricas”, 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Poços de Caldas, MG, pôster, Maio de 2000.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Roganti, M. M.; Silva, C. R.; Silva, J. A. F.; Bottoli, C. B. G.; “Síntese e Caracterização de Novas Fases Monolíticas para Electro cromatografia Capilar Usando Método Sol-gel” no II Simpósio de Cromatografia (SIMCRO), realizado em São Pedro, SP, pôster, Outubro de 2006.
- Roganti, M. M.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Bottoli, C. B. G.; “Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias Monolíticas a partir de Butilmetacrilato para uso em Electro cromatografia Capilar” apresentado durante a 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada em Águas de Lindóia, SP, pôster, Maio-Junho de 2007.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Roganti, M. M.; Silva, C. R.; Silva, J. A. F.; Bottoli, C. B. G.; “Synthesis and Characterization of a New Monolithic Phase for Capillary Electrochromatography with a Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector” no 31<sup>st</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2007), realizado em Ghent, Belgica, pôster, Julho de 2007.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Silva, C. R.; Silva, J. A. F.; Bottoli, C. B. G. “Separation of Amino Acids using Monolithic Silica Column by Capillary Electrochromatography with a Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector” no HPLC 2008, realizado em Baltimore, MD, USA, pôster, Maio de 2008.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aguiar, V. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G.; “Desenvolvimento de metodologia para determinação de parabenos em adoçantes por Electro cromatografia Capilar” no 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XII), realizado em Florianópolis, SC, pôster, Outubro de 2008.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aguiar, V. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G.; “A study of porogenic solvents in the synthesis of methacrylate-based monolithic columns for capillary electrochromatography” no 14º Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biofarmacia e Industria (LACE 2008), realizado em Puerto Vallarta, México, pôster, Novembro de 2008.

- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Silva, C. R.; Bottoli, C. B. G.; “Separation of some drugs by capillary electrochromatography using a new monolithic silica phase” no LACE 2009, realizado em Sevilha, Espanha, pôster, Outubro de 2009.
- Silva, R. G. C.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Silva, C. R.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; “Preparo e aplicação de uma nova fase estacionária monolítica com grupos carboxílicos para eletrocromatografia capilar e  $\mu$ -LC” apresentado durante a 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada em Águas de Lindóia, SP, pôster, Maio 2010.

### 3.2. Artigos publicados

- Gasque, L.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; *et. al.* “Complexation of lead (II) by L-aspartate: cristal structure of polymeric  $Pb(aspH)(NO_3)$ ” **Polyhedron**, 19 (2000) 649.
- Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aguiar, V. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G.; “Determination of parabens in sweeteners by capillary electrochromatography” Aceito..

---

## 4. Outros

---

- Participação do 7<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies, realizado no Instituto de Química da UNICAMP nos dias 13 a 15 novembro 2005.
- Participação no programa estágio docente na disciplina QA 316 durante o 1º semestre de 2006.
- Participação no programa estágio docente na disciplina QA 416 durante o 2º semestre de 2006.
- Participação no I Workshop em Eletroforese Capilar realizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro dia 12 de setembro de 2007.
- Participação no I Workshop em Eletroforese Capilar realizado na Universidade Federal de São Paulo, campus-Diadema no dia 18 de setembro de 2007.
- Participação do treinamento “Diagnóstico e soluções em LC” realizado nas instalações da Agilent Technologies nos dias 18 e 19 de agosto de 2008, com carga horária de 16 horas.
- Realização do curso pré-simpósio de EC ministrado pelo Dr. Norberto A. Guzman no LACE 2008, realizado nos dias 28 e 29 de novembro de 2008 em Puerto Vallarta, México.
- Participação no I Seminário Polimate de Eletroforese Capilar realizado na Universidade de São Paulo dia 27 de abril de 2009.
- Realização do curso pré-simpósio de “Electrophoresis-Mass Spectrometry: desing and applications” ministrado pelos Doutores: Alejandro Cifuentes; Govert W. Somsen e Gerhardus J. de Jon no LACE 2009, realizado nos dias 2 e 3 de outubro de 2009 em Sevilha, Espanha.



## ÍNDICE

Índice de Figuras.....	xxiii
Índice de Tabelas.....	xxix
Lista de abreviaturas .....	xxxi
<b>Capítulo 1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Eletrocromatografia capilar .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1. História da Eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Conceitos eletroforéticos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1. Mobilidade eletroforética e mobilidade aparente.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2. Fluxo eletrosmótico.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Colunas capilares para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1. Colunas recheadas ou particuladas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2. Colunas capilares abertas.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3. Colunas monolíticas.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.3.1. Colunas monolíticas a base de polímeros orgânicos.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.3.2. Colunas monolíticas de sílica.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.3.2.1. Processo sol-gel.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.2.2. Funcionalização dos monolitos à base de sílica.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Fases estacionárias para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1. Fases estacionárias apolares para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.2. Fases estacionárias com grupo polar embutido para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.3. Fases estacionárias polares para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.4. Fases estacionárias de troca iônica para eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5. Avaliação de colunas e fases estacionárias em eletrocromatografia capilar.....</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo 2. Justificativas e Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1. Justificativas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Objetivos.....</b>	<b>38</b>

<b>Capítulo 3. Parte Experimental</b> .....	39
<b>3.1. Materiais e reagentes</b> .....	41
<b>3.2. Equipamentos</b> .....	41
<b>3.2.1. Equipamentos de eletroforese capilar</b> .....	42
<b>3.3. Preparação do monolito de sílica</b> .....	43
<b>3.3.1. Pré-tratamento do capilar</b> .....	43
<b>3.3.2. Mistura reacional do monolito de sílica</b> .....	43
<b>3.4. Caracterização do monolito de sílica</b> .....	44
<b>3.4.1. Microscópio óptico</b> .....	44
<b>3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	44
<b>3.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho</b> .....	45
<b>3.4.4. Análise elementar</b> .....	46
<b>3.5. Síntese do agente sililante</b> .....	46
<b>3.5.1. Caracterização do agente sililante</b> .....	47
<b>3.5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho</b> .....	47
<b>3.5.1.2. Ressonância magnética nuclear</b> .....	47
<b>3.5.1.3. Espectrometria de massas</b> .....	47
<b>3.6. Derivatização do monolito de sílica</b> .....	47
<b>3.6.1. Caracterização do monolito de sílica derivatizado</b> .....	49
<b>3.7. Condicionamento dos monolitos</b> .....	49
<b>3.8. Avaliação eletroforética dos monolitos</b> .....	50
<b>3.8.1. Detecção C<sup>4</sup>D</b> .....	50
<b>3.8.2. Detecção UV</b> .....	50
<b>3.8.2.1. Cella de alta sensibilidade</b> .....	51
<b>Capítulo 4. Resultados e Discussão</b> .....	53
<b>4.1. Preparação da coluna monolítica de sílica</b> .....	55
<b>4.1.1. Preenchimento do capilar</b> .....	55
<b>4.1.2. Caracterização dos monolitos de sílica</b> .....	56
<b>4.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	56
<b>4.1.2.2 Espectroscopia no infravermelho</b> .....	58
<b>4.2. Preparação do agente sililante</b> .....	60

<b>4.2.1. Caracterização do agente sililante.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1.1. Espectroscopia de Infravermelho.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1.2. Análise elementar.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2.1.3. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.1.4. Espectrometria de massas.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3. Derivatização do monolito.....</b>	<b>71</b>
<b>4.3.1. Caracterização do monolito funcionalizado.....</b>	<b>71</b>
<b>4.3.1.1. Análise elementar .....</b>	<b>71</b>
<b>4.3.1.2. Porosidade e área superficial por adsorção de gás (ASAP).....</b>	<b>72</b>
<b>4.3.1.3. Espectroscopia infravermelho.....</b>	<b>73</b>
<b>4.4. Avaliação eletroforética das colunas monolíticas.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4.1. Avaliação eletroforética usando detector condutométrico sem contato (C<sup>4</sup>D).....</b>	<b>74</b>
<b>4.4.1.1. Avaliação eletroforética do monolito sem funcionalizar.....</b>	<b>75</b>
<b>4.4.1.2. Avaliação eletroforética do monolito funcionalizado.....</b>	<b>81</b>
<b>4.4.1.3 Injeção dos aminoácidos arginina, histidina e lisina no monolito funcionalizado .....</b>	<b>98</b>
<b>4.4.2 Avaliação eletroforética do monolito funcionalizado usando detector UV.....</b>	<b>95</b>
<b>4.4.2.1 Separação de compostos neutros.....</b>	<b>95</b>
<b>4.4.2.2 Separação de fármacos.....</b>	<b>103</b>
<b>Capítulo 5. Conclusões .....</b>	<b>109</b>
<b>Referências .....</b>	<b>113</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Equipamento de ECC 1) fonte de alta tensão, 2) reservatórios para tampão, 3) eletrodos, 4) reservatório para amostra, 5) coluna capilar para ECC, 6) detector e 7) microcomputador.....	3
<b>Figura 2.</b> Dupla camada elétrica na parede do capilar e a criação do FEO Adaptada de [15]. .....	7
<b>Figura 3.</b> Perfis de velocidade dos fluxos produzidos por (A) campo elétrico e (B) por pressão. Adaptada de [21]. .....	10
<b>Figura 4.</b> Colunas capilares utilizadas em ECC: (A) recheada, (B) tubular aberta, (C) monolítica. 1. Recobrimento de poliimida; 2. Parede do capilar; 3. Janela de detecção, 4. Filtros. Adaptada de [23].....	10
<b>Figura 5.</b> a) Ilustração esquemática de uma fase estacionária monolítica polimérica. Adaptada de [33] e, b) micrografia de uma fase monolítica de sílica.....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema das reações do processo sol-gel com alcoxisilanos $\text{Si}(\text{OR})_4$ . (A) reação de hidrólise, (B) e (C) reações de condensação.....	16
<b>Figura 7.</b> Diferentes formas de ancoramento dos organossilanos na superfície de sílica (A) monodentado, (B) bidentado e (C) tridentado.....	18
<b>Figura 8.</b> Rotas utilizadas para imobilizar um grupo funcional sobre a superfície de sílica: (A) heterogênea e (B) homogênea. Adaptada de [72].....	18
<b>Figura 9.</b> Estrutura química de uma fase com grupo polar embutido, onde R pode ser uma cadeia de 3 a 17 carbonos.....	27
<b>Figura 10.</b> Interações das fases com grupo ureia embutido e a) silanóis residuais, b) moléculas de água, c) solutos polares e d) entre os próprios grupos polares. Adaptado de [103].....	27
<b>Figura 11.</b> Fotos do conector empregado para fechar os capilares de sílica durante os tratamentos térmicos.....	44
<b>Figura 12.</b> Fotos do sistema empregado para funcionalizar os monolitos de sílica no modo <i>on line</i> , a) tubo <i>peek</i> e conectores, b) bomba seringa.....	48
<b>Figura 13.</b> a) Coluna monolítica capilar montada na cela de alta sensibilidade b) cela de alta sensibilidade aberta e c) esquema interno da cela de alta sensibilidade: 1)	

coluna capilar, 2) adaptador Agilent e 3) adaptador tipo luva de 0,0155 x 0,025 cm para capilar, <i>Micro Tight sleeve Green</i> , Upchurch.....	51
<b>Figura 14.</b> Fotos do sistema para preenchimento de capilares, 1) bomba seringa, 2) seringa para insulina com agulha integrada, 3) conectores e luvas para capilar 4) sistema montado.....	56
<b>Figura 15.</b> Microscopia eletrônica das colunas monolíticas de 1) 75 $\mu\text{m}$ e 2) 50 $\mu\text{m}$ com aumentos de a) 250, b) 1000 e c) 5000 vezes.....	57
<b>Figura 16.</b> Microscopia eletrônica da sílica nua com aumentos de: a) 500 e b) 5000 vezes.....	58
<b>Figura 17.</b> Espectros no Infravermelho para: a) ureia estiramentos (I e II, $\text{NH}_2$ ), (III, $\text{C}=\text{O}$ ) e (IV, $\text{C}-\text{N}$ ) e b) polietilenoglicol (PEG) (V, $\text{O}-\text{H}$ ), (VI, $\text{C}-\text{H}$ ) e (VII, $\text{C}-\text{O}$ ).....	59
<b>Figura 18.</b> Espectros no Infravermelho para a sílica após cada etapa de preparação do monolito: E1) Após 40 $^{\circ}\text{C}$ por 18 h; E2) Após 3 h a 120 $^{\circ}\text{C}$ , sem lavar; E3) Após lavagem; E4) Após 25 h a 330 $^{\circ}\text{C}$ ; E5). Material calcinado e lavado com água, $\text{HNO}_3$ 0,01 mol $\text{L}^{-1}$ e água até pH 7. Estiramentos das ligações (V) $\text{O}-\text{H}$ , (VIII) $\text{H}_2\text{O}$ , (IX) $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ e (X) $\text{Si}-\text{O}$ .....	60
<b>Figura 19.</b> Esquema das reações de obtenção dos agentes sililantes com grupo ureia embutido a) na cadeia alifática b) na cadeia contendo o grupo polar com o grupo ácido carboxílico terminal.....	61
<b>Figura 20.</b> Reação de obtenção do agente sililante 4-AMBS.....	62
<b>Figura 21.</b> Reação de obtenção do agente sililante 4-AMBS segundo Zhang <i>et al.</i> [129].....	63
<b>Figura 22.</b> Espectro no infravermelho para: a) TEPIS, b) 4-AMBS_ DMF e c) PABA.....	64
<b>Figura 23.</b> Espectro no infravermelho para: a) TEPIS, b) 4-AMBS_THF e c) PABA.....	65
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para o 4-AMBS_ DMF.....	67
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em ( $\text{DMSO}, \text{d}_6$ ) para o 4-AMBS_THF.....	68
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ em ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para o 4-AMBS_ DMF H-1, $\text{CH}_3(\text{OEt})$ ; H-2, $\text{OCH}_2$ ; H-3, $\text{SiCH}_2$ ; H-4, $\text{CH}_2$ ; H-5, $\text{NCH}_2$ ; H-8, ArH; H-7, NH; H-6, NH; H-9, ArH e H-10, $\text{COOH}$ .....	69
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ em ( $\text{DMSO}, \text{d}_6$ ) para o 4-AMBS_THF H-1, $\text{CH}_3(\text{OEt})$ ; H-2, $\text{OCH}_2$ ; H-3, $\text{SiCH}_2$ ; H-4, $\text{CH}_2$ ; H-5, $\text{NCH}_2$ ; H-8, ArH; H-7, NH; H-6, NH;	

H-9, ArH e H-10, COOH.....	69
<b>Figura 28.</b> Espectro de infravermelho para o monolito antes e depois da derivatização.....	73
<b>Figura 29.</b> Eletroferogramas das injeções de a) $K^+$ e b) $NH_4^+$ 1 mmol $L^{-1}$ . Monolito sem funcionalizar d.i. de 50 $\mu m$ e 50 cm de comprimento; tampão: 25 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocínética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; 25,1 $^{\circ}C$ ; detector $C^4D$ funcionando a 453 kHz; 3,1 $V_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.....	76
<b>Figura 30.</b> Eletroferogramas de 2 injeções da mistura de $K^+$ e $NH_4^+$ 1 mmol $L^{-1}$ ; empregando: a) Monolito sem funcionalizar 50 $\mu m$ de d.i., $L = 50$ cm e b) Capilar vazio 50 $\mu m$ de d.i., $L = 44$ cm. Tampão: 25 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético, pH 7,5, injeção eletrocínética, 3 s, 5 kV. Potencial 25 kV; 25,1 $^{\circ}C$ ; detector $C^4D$ funcionando a 453 kHz, 3,1 $V_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.....	77
<b>Figura 31.</b> Eletroferogramas de três injeções da mistura de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ 1 mmol $L^{-1}$ ; a) Monolito não funcionalizado com 50 $\mu m$ de d.i., $L = 55$ cm e b) Capilar vazio com 50 $\mu m$ de d.i., $L = 44$ cm; tampão: 25 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético, pH 7,5; injeção eletrocínética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; 25,1 $^{\circ}C$ ; detector $C^4D$ funcionando a 453 kHz, 3,1 $V_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	78
<b>Figura 32.</b> Esquema da adsorção do tampão Tris na superfície do monolito.....	80
<b>Figura 33.</b> Eletroferogramas da mistura teste de $K^+$ e $Na^+$ 1 mmol $L^{-1}$ ; tampão: pH 7,5, 20 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV; 25,1 $^{\circ}C$ ; a) Coluna A de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 60$ cm e b) Capilar de sílica vazio de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 55$ cm. Detector $C^4D$ funcionando em 583 kHz e 1,3 $V_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	82
<b>Figura 34.</b> Eletroferogramas da mistura teste de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ 1 mmol $L^{-1}$ ; Tampão: pH 7,5, 20 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV; 25,1 $^{\circ}C$ ; a) Coluna A de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 60$ cm, b) Capilar de sílica vazio de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 55$ cm. Detector $C^4D$ funcionando em 583 kHz e 1,3 $V_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	83
<b>Figura 35.</b> Eletroferogramas da mistura de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ 1 mmol $L^{-1}$ ; tampão: 20 mmol $L^{-1}$ tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocínética: 10 s; 5 kV; potencial 25 kV; 25 $^{\circ}C$ ; a) monolito funcionalizado B de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 55$ cm; b) capilar de sílica vazio de 50 $\mu m$ de d.i. $L = 52$ cm. Detector $C^4D$ funcionando em 555 kHz e 2,0 $V_p$ ;	

equipamento Waters.....	85
<b>Figura 36.</b> Eletroferogramas dos analitos $K^+$ e $Ca^{2+}$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $H_2O$ ; tampão: $20 \text{ mmol L}^{-1}$ tris/ácido acético, pH 7,5; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV; $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; a), c) e e) monolito funcionalizado B de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 55 \text{ cm}$ e b), d) e f) capilar de sílica $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 52 \text{ cm}$ . Detector $C^4D$ funcionando em $555 \text{ kHz}$ e $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.....	86
<b>Figura 37.</b> Eletroferogramas dos analitos $Na^+$ e $Ca^{2+}$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; tampão: $30 \text{ mmol L}^{-1}$ MES/His, pH 6,0; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV; a) Monolito funcionalizado B de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 55 \text{ cm}$ e b) Capilar de sílica de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 51,7 \text{ cm}$ ; $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector $C^4D$ funcionando em $555 \text{ kHz}$ e $2,0 \text{ V}_p$ . Equipamento Waters.....	88
<b>Figura 38.</b> Eletroferogramas de injeções dos analitos $K^+$ , $Ca^{2+}$ , $Na^+$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ e $H_2O$ ; monolito funcionalizado B de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 55 \text{ cm}$ ; tampão: $30 \text{ mmol L}^{-1}$ MES/His, pH 6,0; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV; $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector $C^4D$ funcionando em $555 \text{ kHz}$ e $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.....	90
<b>Figura 39.</b> Eletroferogramas de 3 injeções de a) $Na^+$ e b) $Ca^{2+}$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; monolito funcionalizado D de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 50 \text{ cm}$ , e 3 injeções de c) $Na^+$ e d) $Ca^{2+}$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; capilar de sílica vazio de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 50 \text{ cm}$ ; tampão: $25 \text{ mmol L}^{-1}$ tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocinética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector $C^4D$ funcionando a $453 \text{ kHz}$ ; $3,1 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	91
<b>Figura 40.</b> Eletroferogramas de 3 injeções de a) $NH_4^+$ , b) $K^+$ e c) $NH_4^+$ e $K^+$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Coluna D, monolito funcionalizado de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 50 \text{ cm}$ e d) $NH_4^+$ , e) $K^+$ e f) $NH_4^+$ e $K^+$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; capilar de sílica vazio de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. $L = 44 \text{ cm}$ , tampão: $25 \text{ mmol L}^{-1}$ tris/ácido acético, pH 7,5; injeção eletrocinética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; $25,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector $C^4D$ funcionando em $453 \text{ kHz}$ ; $3,1 \text{ V}_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.....	93
<b>Figura 41.</b> Eletroferogramas de injeções dos analitos: a) $K^+$ e $NH_4^+$ , b) $H_2O$ , c) $NH_4^+$ e d) $K^+$ $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; monolito funcionalizado D de $50 \text{ }\mu\text{m}$ de d.i. e $50 \text{ cm}$ de comprimento; tampão: $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido acético/tris, pH 4,5; injeção eletrocinética: 3 s, 5 kV; potencial: 25 kV; $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector $C^4D$ funcionando em $453 \text{ kHz}$ ; $3,1 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	95
<b>Figura 42.</b> Eletroferogramas de injeções dos analitos: a) $NH_4^+$ , b) $K^+$ , c) $NH_4^+$ e $K^+$	

1 mmol L <sup>-1</sup> e d) acetato de amônio, tris e H <sub>2</sub> O qualitativa; capilar de sílica de 50 μm de d.i. e 44 cm de comprimento; tampão: 25 mmol L <sup>-1</sup> ácido acético/tris, pH 4,5; injeção eletrocínética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; 25 °C; detector C <sup>4</sup> D funcionando em 453 kHz; 3,1 V <sub>p</sub> ; equipamento desenvolvido no laboratório.....	96
<b>Figura 43.</b> Representação esquemática da fase funcionalizada e sua interação com os íons Tris <sup>+</sup> presentes na solução tampão.....	98
<b>Figura 44.</b> Eletroferogramas da mistura teste de Arg, His e Lis 1 mmol L <sup>-1</sup> ; em a) monolito funcionalizado D de 50 μm de d.i., L = 54 cm, b) capilar de sílica vazio de 50 μm de d.i., L = 51,7 cm; tampão: 20 mmol L <sup>-1</sup> tris/ácido acético, pH 5,0; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV; 25 °C; detector C <sup>4</sup> D funcionando em 555 kHz e 2,0 V <sub>p</sub> ; equipamento Waters.....	100
<b>Figura 45.</b> Mobilidades efetivas μ de Arg, His e Lis 1 mmol L <sup>-1</sup> ; em a) Monolito funcionalizado D de 50 μm de d.i., L = 54 cm, b) Capilar de sílica vazio de 50 μm de d.i., L = 51,7 cm; tampão: 20 mmol L <sup>-1</sup> tris/ácido acético, pH 5,0; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV; 25°C; detector C <sup>4</sup> D funcionando em 555 kHz e 2,0 V <sub>p</sub> ; equipamento Waters.....	100
<b>Figura 46.</b> Estruturas de a) etilbenzeno, b) propilbenzeno, c) butilbenzeno e d) pentilbenzeno.....	101
<b>Figura 47.</b> Estruturas de a) metilparabeno, b) etilparabeno, c) propilparabeno e d) butilparabeno.....	102
<b>Figura 48.</b> Eletroferogramas de injeções de tiourea e alquilbenzenos 5 mmol L <sup>-1</sup> ; coluna E de 50 μm de d.i. L = 40 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L <sup>-1</sup> a) 30:70 v/v, b) 50:50 v/v e c) 70:30 v/v, pH 8,0; injeção eletrocínética: 5 s, 10 kV; potencial: 30 kV; 25 °C ; detecção UV em 214 nm.....	102
<b>Figura 49.</b> Estruturas de 1) paracetamol, 2) fenacetina, 3) propranolol, 4) atenolol.....	103
<b>Figura 50.</b> Eletroferograma da injeção da mistura de (1) tiourea 5 mmol L <sup>-1</sup> ; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 μg mL <sup>-1</sup> ; coluna E de 50 μm de d.i. L = 40 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L <sup>-1</sup> 70:30 v/v, a) pH 7,5 e b) pH 8,0; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial: 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm....	104
<b>Figura 51.</b> Eletroferogramas de três injeções de (1) tiourea 5 mmol L <sup>-1</sup> ; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 μg mL <sup>-1</sup> ; Capilar de sílica 50 μm de d.i. L = 70 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L <sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 7,5; injeção eletrocínética: 5 s, 10 kV; potencial 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214	

nm.....	105
<b>Figura 52.</b> Eletroferogramas da injeção da mistura de (1) tiourea 5 mmol L <sup>-1</sup> ; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 µg mL <sup>-1</sup> ; Coluna F de 50 µm de diâmetro interno L = 41 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L <sup>-1</sup> 70:30 v/v; pH 8,0; Injeção eletrocínica: 10 s; 5 kV; potencial 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm.....	105
<b>Figura 53.</b> Estruturas dos fármacos (1) amitriptilina; (2) nortriptilina e (3) clorfeniramina.....	106
<b>Figura 54.</b> Eletroferogramas dos fármacos (1) amitriptilina; (2) nortriptilina; (3) clorfeniramina 500 µg mL <sup>-1</sup> ; Coluna F de 50 µm de d.i. L = 38 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L <sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 8,0; injeção eletrocínica: 5 s, 10 kV; potencial 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm.....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fases estacionárias monolíticas usadas em ECC, adaptada de [71].....	19
<b>Tabela 2.</b> Tratamentos realizados durante a síntese dos monolitos de sílica.....	45
<b>Tabela 3.</b> Analitos analisados e condições de trabalho dos detectores C <sup>4</sup> D.....	50
<b>Tabela 4.</b> Teste de solubilidade da glicina em vários solventes e misturas.....	62
<b>Tabela 5.</b> Comparação dos resultados esperados para o 4-AMBS (C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> Si) e os obtidos pela análise elementar.....	65
<b>Tabela 6.</b> Comparação dos resultados esperados e os obtidos na análise elementar do 4-AMBS_THF.....	66
<b>Tabela 7.</b> Deslocamentos químicos do 4-AMBS no espectro de RMN de <sup>1</sup> H. ....	70
<b>Tabela 8.</b> Comparação dos resultados obtidos na análise elementar para os monolitos de sílica antes e depois da funcionalização com o 4-AMBS_DMF.....	71
<b>Tabela 9.</b> Comparação dos resultados das áreas superficiais (SBET), área recoberta ( $\chi$ ), volumes e diâmetro de poro da sílica antes e depois da funcionalização com o 4-AMBS_DMF.....	72
<b>Tabela 10.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de K <sup>+</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> na coluna monolítica sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5. *.....	77
<b>Tabela 11.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup> na coluna monolítica sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5. *.....	79
<b>Tabela 12.</b> Mobilidades do FEO no monolito sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5.*.....	80
<b>Tabela 13.</b> Características das fases estacionárias funcionalizadas.....	81
<b>Tabela 14.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de K <sup>+</sup> e Na <sup>+</sup> na coluna monolítica funcionalizada (Coluna A) e no capilar vazio, pH 7,5.....	82
<b>Tabela 15.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup> na coluna A monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.....	84
<b>Tabela 16.</b> Mobilidades do FEO no monolito funcionalizado A e no capilar vazio, pH 7,5.....	84

<b>Tabela 17.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de $\text{Na}^+$ e $\text{K}^+$ na coluna B monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 7,5.....	87
<b>Tabela 18.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de $\text{Na}^+$ e $\text{Ca}^{2+}$ na coluna B monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 6,0.....	89
<b>Tabela 19.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de $\text{Na}^+$ na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.....	92
<b>Tabela 20.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de $\text{NH}_4^+$ e $\text{K}^+$ na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.....	94
<b>Tabela 21.</b> Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de $\text{NH}_4^+$ e $\text{K}^+$ na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 4,5.....	97
<b>Tabela 22.</b> Estruturas e pKa dos aminoácidos Arg, His e Lis.....	99
<b>Tabela 23.</b> Fatores de retenção ( $k'$ ) de: tioureia, paracetamol, fenacetina, propranolol e atenolol nas colunas E e F; Tampão: ACN/Tris 25 mmol L <sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 8,0.....	106

## Lista de Abreviaturas

eletrocromatografia capilar (ECC)  
eletroforese capilar (EC)  
cromatografia líquida capilar (CLC)  
fase estacionária (FE)  
fase móvel (FM)  
fluxo eletrosmótico (FEO)  
octadecilsilano (ODS)  
eletroforese capilar de zona (ECZ)  
constante dielétrica ( $\epsilon$ )  
viscosidade do eletrólito ( $\eta$ )  
mobilidade eletroforética, ( $\mu_e$ )  
potencial zeta ( $\zeta$ ).  
tetrametoxissilano (TMOS)  
tetraetoxissilano (TEOS)  
metacriloxipropiltrimetoxissilano (MPTMS)  
polióxido de etileno (POE)  
polietileno glicol (PEG),  
estireno (S),  
divinilbenzeno (DVB)  
lauril metacrilato (LMA)  
propilgalato (PG),  
galato de octila (GO),  
butil-hidroxianisol (BHA),  
2,6-di-terbutil-4-metilfenol (BHT)  
terbutil-hidroquinona (TBHQ)

etilenodimetacrilato (EDMA)  
ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanossulfônico (AMPS)  
diacrilato de fenileno-naftil (NPM)  
diacrilato de 1,4-fenileno (PDA)  
trimetilolpropano (TRIM)  
ECC pressurizado (pECC)  
organofosforados (POF)  
ácido (2-N-morfolino)etano sulfônico (MES)  
riboflavina (RF),  
mononucleotídeo de flavina (FMN)  
dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD)  
3-cloropropiltrimetoxissilano (CPTMS)  
N,N-dimetil-N-dodecilamina (DMDA)  
nanopartículas de ouro (AuNP)  
butilmetacrilato (BMA)  
succinato de mono-(2-metacrilóilóxi)etileno (SME)  
strong cation-exchange (SCX)  
pentaeritritoltriacrilato (PETA)  
N,N-dimetil-N-metacrilóxi-etil-N-(3-sulfopropil) betaína de amônio (DMMSA)  
limite de detecção (LD)  
nanotubos de carbono (CNT)  
microscopia eletrônica de varredura (MEV)  
espectroscopia de infravermelho (IV)  
cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDAC)  
3-aminopropiltrióxissilano (APTMS)  
coupled contactless conductivity detection (C<sup>4</sup>D)



# **CAPÍTULO 1**

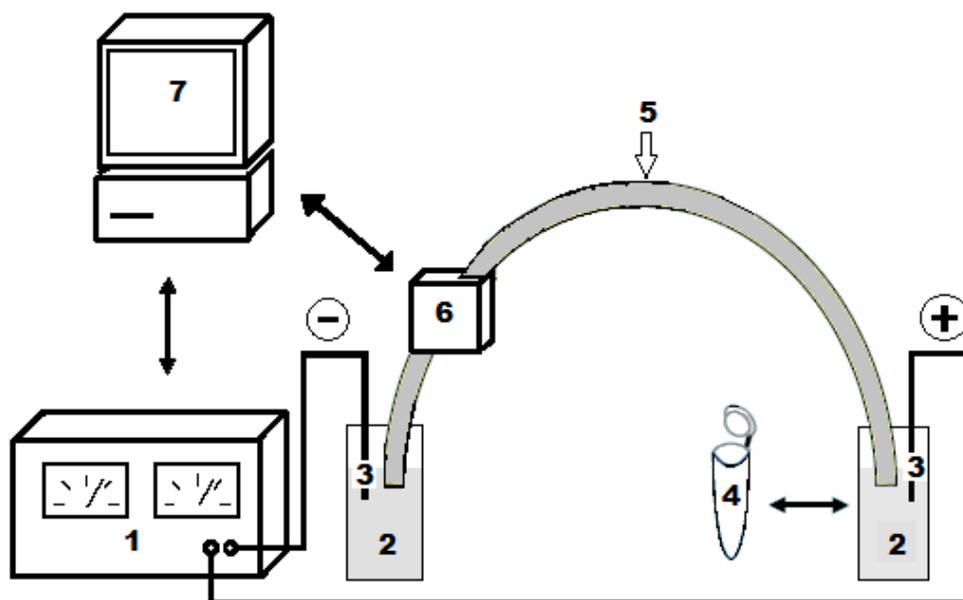
## **INTRODUÇÃO**



## 1.1. Eletrocromatografia capilar

A eletrocromatografia capilar (ECC) é uma técnica de separação instrumental definida como um híbrido entre eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida capilar (CLC) [1]. Nesta fusão de técnicas, a miniaturização e a alta eficiência comum na EC foram complementadas com a seletividade da CLC. Assim, as separações por ECC podem ser alcançadas pela partição diferencial entre a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM), eletromigração diferencial, ou uma combinação de ambos os mecanismos. Esta característica proporciona à ECC um grande potencial de aplicações [2].

O equipamento de ECC é basicamente o mesmo que usado para EC, tendo como única diferença a coluna capilar, já que nela está alojada a FE. A Figura 1 apresenta um esquema da instrumentação composta de fonte de alta tensão (1), reservatórios para o tampão (2), eletrodos (3), reservatório de amostra (4), coluna capilar (5), detector (6) e processador (7).



**Figura 1.** Equipamento de ECC 1) Fonte de alta tensão, 2) reservatórios para tampão, 3) eletrodos, 4) reservatório para amostra, 5) coluna capilar para ECC, 6) detector e 7) microcomputador.

A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo da coluna capilar. Ela é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólito conveniente (geralmente um tampão). As colunas capilares são preenchidas com tampão e servem como canal de migração. As extremidades da coluna são imersas nos reservatórios do tampão para completar o contato elétrico.

### 1.1.1. História da eletrocromatografia capilar

A história da eletrocromatografia pode ser acompanhada desde 1939, quando Strain [3,4] aplicou um campo elétrico em uma coluna contendo como FE alumina para demonstrar o aumento da seletividade devido à combinação de forças de separação eletroforéticas e cromatográficas na separação de pigmentos.

Em 1943, Berraz [5] introduziu o termo eletrocromatografia para descrever uma forma de eletroforese em papel. No final de 1940 e início de 1950, Tiselius, Synge e Mould [6-9] sugeriram a utilização da eletrosmose para mover solvente através de uma estrutura porosa, evitando o uso de pressão hidrostática.

Em 1974, Pretorius *et al.* [10] mostraram que uma diferença de potencial, ao invés de pressão, poderia ser usada para bombear a FM através de uma coluna recheada com micropartículas de sílica. Entretanto, devido à dissipação deficiente do calor gerado pela corrente elétrica (efeito Joule) em colunas com diâmetro interno grande, só foi possível a aplicação de campos elétricos baixos, resultando em um fluxo eletrosmótico (FEO) lento e, conseqüentemente, análises demoradas.

A primeira separação empregando colunas capilares foi feita por Jorgenson e Lukacs [11] em 1981, utilizando eletrodos de grafite e tensão de 30 kV aplicada a um capilar de 170  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (d.i.), recheado com partículas de sílica Partisil-10 ligadas ao grupo octadecilsilano (ODS). Utilizou-se detecção por fluorescência na própria coluna (*on-column*) e os analitos separados foram 9-metilantraceno e perileno, com eficiências de 31000 e 23000 pratos  $\text{m}^{-1}$ , respectivamente. A utilização de capilares possibilitou uma dissipação rápida do

calor gerado permitindo a aplicação de tensões elevadas e a obtenção de separações eficientes em tempos relativamente curtos.

Em 1982, Tsuda *et al.* [12] fizeram a primeira aplicação empregando colunas capilares recobertas (tubulares abertas) com FE do tipo C18 em ECC para a separação de compostos aromáticos.

Posteriormente, em 1987 e 1991, Knox e Grant [13, 14] publicaram dois trabalhos nos quais estudaram alguns aspectos fundamentais da ECC, como o perfil do FEO, a sua relação com o diâmetro das partículas da FE e a necessidade de diminuir o diâmetro interno dos capilares para evitar o efeito Joule. Os autores mostraram que é possível obter separações mais eficientes, em uma mesma coluna, utilizando fluxos gerados eletricamente ao invés de fluxos pressurizados. A partir destes trabalhos, pôde-se notar um aumento significativo das pesquisas em ECC, como previsto pelos próprios autores.

## 1.2. Conceitos eletroforéticos

Para compreender a ECC é necessário entender alguns conceitos eletroforéticos, que são inseridos a seguir.

Em eletroforese capilar de zona (ECZ) dois fenômenos podem ser considerados essenciais para explicar a separação dos analitos: a migração eletroforética e a migração eletrosmótica. A migração eletroforética é um fenômeno de migração de partículas carregadas em uma solução condutora (eletrólito) sob influência de um campo elétrico. A eletrosmose é um fenômeno onde partículas sólidas carregadas estão imobilizadas (como, por exemplo, a parede interna de um tubo de sílica e/ou partículas de sílica dentro de um tubo) e, quando for aplicada uma diferença de potencial, em vez das partículas migrarem através do eletrólito, o líquido é que migra através do sólido, gerando o FEO [11]. A seguir serão descritos ambos os fenômenos com maior detalhe.

### 1.2.1. Mobilidade eletroforética e mobilidade aparente

O movimento (migração) de espécies carregadas sob a influência de um campo elétrico é caracterizado pela mobilidade eletroforética,  $\mu_{ef}$ , a qual tem unidades de  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ . A mobilidade não depende só da densidade de carga do soluto (carga e tamanho da molécula), mas também da constante dielétrica ( $\epsilon$ ) e da viscosidade do eletrólito ( $\eta$ ). Na presença de FEO (item 2.2), a mobilidade “aparente” ( $\mu_a$ ) é a soma das mobilidades eletroforéticas do analito,  $\mu_e$ , e a mobilidade do FEO,  $\mu_{FEO}$ :

$$\mu_a = \mu_{ef} + \mu_{FEO} \quad \text{Eq. 1}$$

A mobilidade aparente pode ser determinada, experimentalmente, usando a equação 2:

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t_a V} \quad \text{Eq. 2}$$

onde  $l$  é a distância desde o ponto de injeção até o detector,  $t_a$  é o tempo que a espécie leva para migrar até o detector e  $E$  é o campo elétrico ( $V/L$ ), onde  $V$  é a voltagem aplicada e  $L$  é a distância entre os dois eletrodos, que é o comprimento total do capilar.

Ao se estabelecer um potencial elétrico, os íons adquirem velocidades eletroforéticas ( $v_{ef}$ ), as quais são dependentes da intensidade do campo elétrico ( $E$ ) e da  $\mu_{ef}$  de cada espécie envolvida, segundo a equação 3:

$$v_{ef} = \mu_{ef} E = \frac{\mu_{ef} V}{L} \quad \text{Eq. 3}$$

Em presença do FEO, a equação 3 pode ser reescrita como:

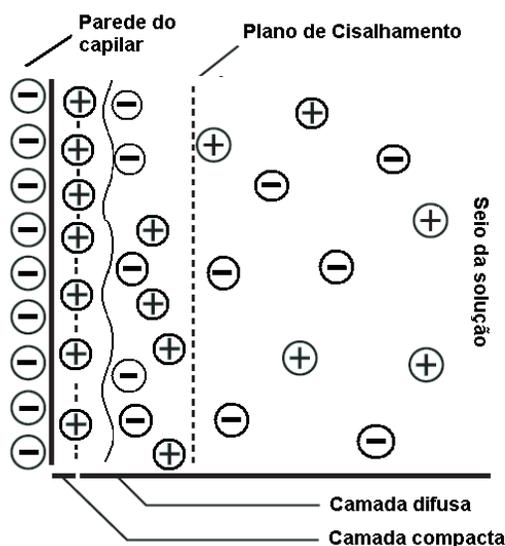
$$v_a = \mu_a E = \frac{\mu_a V}{L} \quad \text{Eq. 4}$$

### 1.2.2. Fluxo eletrosmótico

Dentre os vários tipos de capilares usados em EC (teflon, pyrex e sílica) o capilar de sílica fundida é atualmente o mais usado. Por ser um material dielétrico, o mesmo permite o emprego de alta tensão, além de possuir um recobrimento externo de poliimida que lhe proporciona uma melhor resistência mecânica. O capilar de sílica contém grupos silanóis (Si-OH) com um pKa médio de 5,9 [15], os quais ionizam quando estão em contato com uma solução eletrolítica (comumente uma solução tampão), de acordo com [16, 17]:



Com a ionização, a superfície do capilar fica carregada negativamente e uma camada de contra-íon, no caso cátions do tampão, é estabelecida a fim de contrabalançar o excesso de cargas negativas e, dessa forma, manter a eletroneutralidade no meio. Assim, se estabelece uma dupla camada elétrica (DCE) (Figura 2) e é gerada uma diferença de potencial, que é chamada de potencial zeta ( $\zeta$ ).



**Figura 2.** Dupla camada elétrica na parede do capilar e a criação do FEO. Adaptada de [15].

A primeira camada é firmemente ligada com forças eletrostáticas (camada compacta) e a outra é mais fracamente ligada (camada difusa). Ao se aplicar o campo elétrico dentro da coluna capilar ocorre o deslocamento das cargas presentes da camada difusa no sentido do eletrodo de carga contrária. No processo de migração, os íons transportam consigo moléculas de água, o que induz, por sua vez, um fluxo da solução como um todo, sendo este processo conhecido como FEO [15].

Após o potencial elétrico ser estabelecido (geralmente entre 5 e 30 kV), os íons (positivos) e as moléculas solvatadas migram em direção ao pólo negativo, sendo este considerado o FEO normal.

O FEO está relacionado diretamente com o pH do eletrólito de corrida, visto que o  $\zeta$  está ligado à ionização dos grupos silanóis da sílica. Em valores de pH abaixo de 4,0, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o FEO é baixo, enquanto que em valores de pH acima de 9,0, os silanóis ficam completamente ionizados e, portanto, o FEO é alto. A magnitude do FEO pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade, segundo as equações:

$$v_{\text{FEO}} = \frac{l}{\Delta t} \quad \text{Eq. 5}$$

onde  $\Delta t$  é o intervalo de tempo necessário para o FEO percorrer o capilar.

$$\mu_{\text{FEO}} = \frac{l}{Et} \quad \text{Eq. 6}$$

onde  $t$  é tempo necessário para o FEO percorrer o capilar.

A relação da  $v_{\text{FEO}}$  em função da mobilidade e do campo elétrico é dada por:

$$v_{\text{FEO}} = \mu_{\text{FEO}} \cdot E \quad \text{Eq. 7}$$

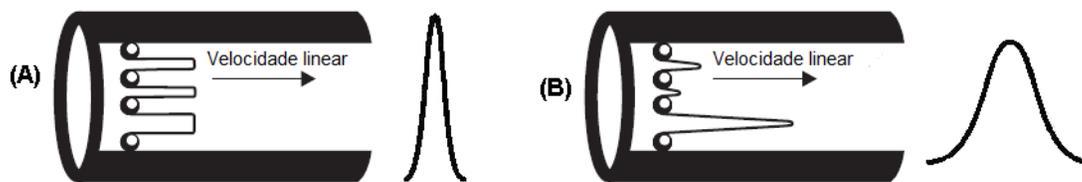
A presença do FEO indica que a migração das espécies, dentro do capilar, não depende somente de suas respectivas mobilidades eletroforéticas, mas também da mobilidade do FEO, como mencionado na equação 1.

Além do valor de pH, existem outros fatores que alteram o FEO e torna-se necessário o controle dos mesmos com o intuito de mantê-lo estável durante uma análise. Dentre estes fatores estão: viscosidade ( $\eta$ ) e temperatura (T). O aumento da viscosidade do meio dificulta a mobilidade dos íons na solução, ocasionando uma diminuição no valor da mobilidade do FEO. Mudanças de temperatura na ordem de apenas um grau Kelvin acarretam variações de até 2% na viscosidade do eletrólito e, por consequência, na mobilidade do FEO. A temperatura também pode influenciar o valor de pH do eletrólito e causar variações de 0,5% [15,18]. Dessa maneira, para se manter a reprodutibilidade nos resultados em EC, a temperatura deve ser constante [15].

A força iônica do eletrólito também pode causar efeito na variação da mobilidade do FEO. Eletrólitos com elevada força iônica produzem compressão da dupla camada elétrica e, com isso, diminuem o FEO.

Assim como em ECZ, o FEO em ECC se origina com a formação da dupla camada elétrica que, por sua vez, é formada na interface sólido-líquido da FE, quando esta entra em contato com uma solução eletrolítica, sob a ação de um campo elétrico. Este fenômeno foi explicado por Pretorius *et al.* [10].

Um aspecto interessante do FEO (observado tanto em ECZ quanto em ECC) é que este apresenta um perfil de velocidade linear praticamente planar, ou seja, as componentes da velocidade eletrosmótica dos analitos em diferentes regiões do capilar são iguais, enquanto o fluxo pressurizado, que ocorre em CLC, apresenta um perfil parabólico e os analitos no centro do capilar migram mais rapidamente que aqueles próximos à parede do tubo, causando alargamento do pico, reduzindo a eficiência da separação. No caso da ECC a eficiência aumenta, pois o FEO mantém os analitos em bandas estreitas, como mostra a Figura 3 [19, 20].

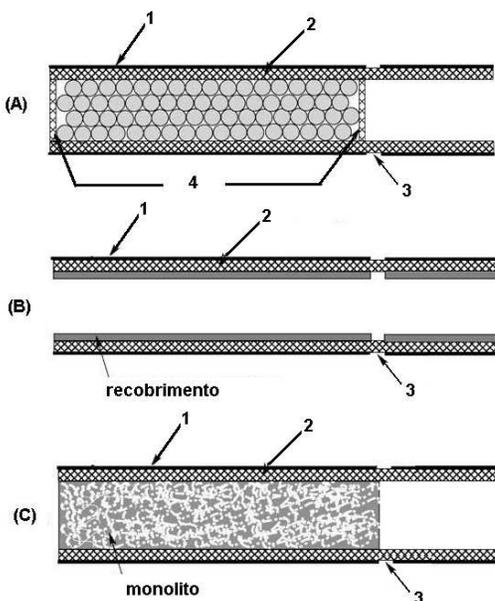


**Figura 3.** Perfis de velocidade dos fluxos produzidos por (A) campo elétrico e (B) por pressão. Adaptada de [21].

### 1.3. Colunas capilares para eletrocromatografia capilar

A coluna é a parte mais importante do sistema de ECC já que dela depende a seletividade para realizar as separações. Por isso, o desenvolvimento de FE para a mesma tem sido o foco de várias pesquisas recentes. Alguns artigos descrevem os procedimentos de preparação de novas FE e colunas e outros apenas as melhorias nos processos de confecção das já existentes [22].

As colunas capilares utilizadas em ECC podem ser classificadas em três tipos: recheadas com partículas, tubulares abertas e monolíticas (Figura 4). A seguir serão descritas cada uma destas colunas.



**Figura 4.** Colunas capilares utilizadas em ECC: (A) recheada, (B) tubular aberta, (C) monolítica. 1. Recobrimento de poliimida; 2. Parede do capilar; 3. Janela de detecção, 4. Filtros. Adaptada de [23].

### 1.3.1. Colunas recheadas ou particuladas

As colunas recheadas foram as primeiras usadas em ECC e consistem em capilares recheados com partículas de sílica cromatográfica com diâmetros de 1,5  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . Possuem dois filtros para reter o recheio dentro da coluna, como pode ser observado na Figura 4(A). Assim como em CLAE, existe disponível comercialmente uma grande variedade de sílicas modificadas que podem ser utilizadas como FE em ECC, permitindo diferentes mecanismos de separação [21]. Outra vantagem das colunas recheadas é a elevada capacidade de amostra, proporcionada pela grande área superficial do suporte cromatográfico.

Apesar da versatilidade das diferentes FE, é necessária muita habilidade para inserir as partículas dentro das colunas e obter recheios uniformes de uma maneira reprodutível, já que os tubos capilares possuem diâmetro reduzido. Além disso, os filtros devem ser estáveis nas extremidades destas colunas. As colunas com recheios não uniformes podem apresentar separações com baixa eficiência, pouca resolução e picos assimétricos. Devido ao processo de enchimento, as colunas capilares recheadas têm custo elevado e apresentam problemas de reprodutibilidade [24]. Além disso, é extremamente difícil evitar os efeitos provenientes dos filtros, como formação de bolhas e heterogeneidade do campo elétrico ao longo da coluna. Também as colunas apresentam a mesma fragilidade que os capilares para EC na região da janela de detecção pois, para a confecção desta janela, é preciso remover parte da poliimida que recobre o capilar.

Buscando minimizar estes problemas, várias alternativas têm sido propostas, entre elas a aplicação de pequena pressão no capilar, a degaseificação do eletrólito, o uso de baixas concentrações de tampão ou de baixas temperaturas [25], o desenvolvimento de diferentes métodos de fabricação dos filtros [26] e até a não-utilização dos mesmos [25]. Esta última alternativa estuda novos formatos das colunas capilares (como a redução do diâmetro nas duas extremidades) e estimulou a pesquisa para o uso das colunas capilares abertas e monolíticas em ECC.

### 1.3.2. Colunas capilares abertas

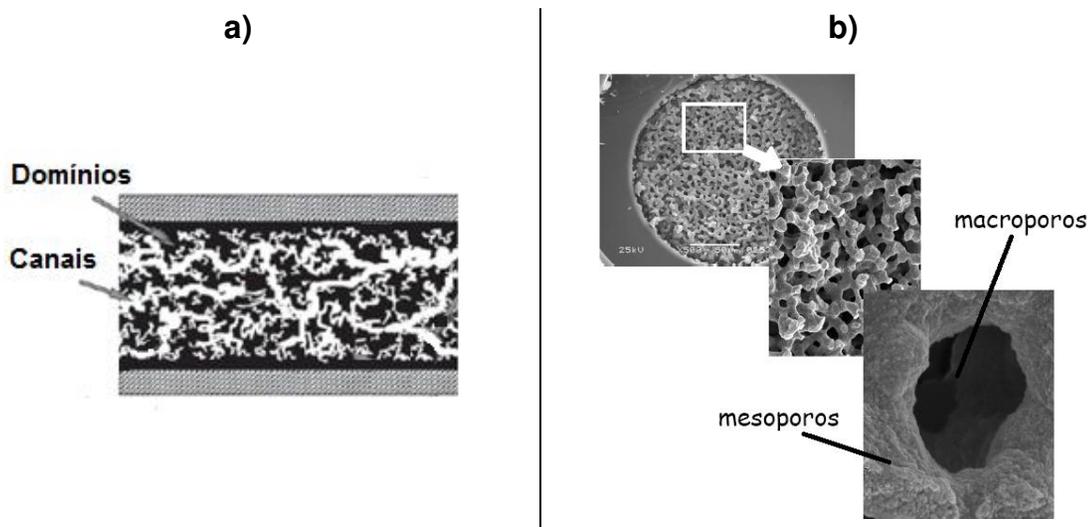
As colunas capilares abertas ou tubulares abertas com paredes recobertas (WCOT, do inglês “*wall-coated open-tubular*”) contêm a FE recobrindo as paredes dos tubos, como ilustrado na Figura 4(B). Este tipo de coluna é mais fácil de preparar do que as colunas recheadas e dispensa o uso dos filtros para manter a FE no interior do capilar, o que permite análises mais rápidas, pois há melhor dissipação do calor quando são aplicadas tensões mais elevadas. Entretanto, estas colunas apresentam menor capacidade de amostra que as colunas recheadas e as monolíticas, devido à menor razão entre área e volume [27].

As FE empregadas nas colunas capilares abertas podem ser quimicamente ou fisicamente ligadas. As fases quimicamente ligadas envolvem a ligação de grupos orgânicos à superfície da sílica por meio de reações de silanização, hidrossililação e polimerização [28]. As FE adsorvidas utilizam interações eletrostáticas entre a superfície da sílica e o ligante (por exemplo, surfactantes) [29].

### 1.3.3. Colunas monolíticas

Os monolitos são meios contínuos porosos de separação (fase ou suporte contendo uma “partícula única”), como mostrado na Figura 4(C). A fase monolítica possui comumente um formato cilíndrico, com uma estrutura sólida altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem alta permeabilidade e alta eficiência de coluna (Figura 5). Os domínios podem ser micro ou mesoporosos, ter estrutura dupla de poros (micro e mesoporos), ou podem ser não-porosos [30]. Segundo a *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), os microporos são poros com diâmetros que não excedem a 2 nm (20 Å), os macroporos são definidos como poros com diâmetros superiores a 50 nm (500 Å), e os mesoporos são poros de tamanhos intermediários a estes, 2 a 50 nm [31]. O eletrólito passa pela coluna principalmente através dos canais do monolito, nominalmente de 2 µm de diâmetro. A estrutura e a geometria destes

canais oferecem uma menor resistência à vazão da fase móvel, comparada aos materiais particulados [32].



**Figura 5.** a) Ilustração esquemática de uma fase estacionária monolítica polimérica. Adaptada de [33] e, b) micrografia de uma fase monolítica de sílica.

As colunas monolíticas podem ser preparadas *in situ*. Durante a década de 1990, Svec e Fréchet [34] introduziram os métodos de preparação de monolitos orgânicos formados por macroporos rígidos, de forma muito simples. Em 1996, Minakushi *et al.* [35], empregando o processo sol-gel, prepararam monolitos de sílica derivatizada com grupos octadecil, similar ao processo de preparo de FE para CLAE.

Entretanto, a popularização das FE monolíticas só aconteceu a partir do ano 2000, quando colunas contendo monolitos de sílica tornaram-se disponíveis comercialmente para uso em CLAE. Ao longo destes últimos dez anos, os materiais monolíticos tiveram ampla difusão, com algumas centenas de trabalhos publicados. Apesar do emprego destas fases estacionárias em várias técnicas, tais como microextração em fase sólida [36], cromatografia de bioafinidade [37], cromatografia de injeção sequencial [38], dentre outros, foi em CLAE e em ECC que tiveram as maiores aplicações, principalmente pela série de vantagens oferecidas pelas fases monolíticas. Devido à facilidade de preparo e a ausência de filtros retentores, as FE monolíticas vêm sendo cada vez mais usadas em ECC.

Além disso, o processo de preparo destas fases é simples e permite a incorporação de espécies carregadas nas FE, necessárias para garantir o FEO.

Dependendo da natureza do material monolítico, duas categorias podem ser identificadas:

i) Colunas monolíticas baseadas em polímeros orgânicos, tais como acrilamida, acrilato ou metacrilato e estirenos [39-43].

ii) Colunas monolíticas baseadas em sílica, geralmente preparadas usando a tecnologia sol-gel [44-46].

### **1.3.3.1. Colunas monolíticas a base de polímeros orgânicos**

Dentre as características dos monolitos baseados em polímeros orgânicos, podem ser citadas: tolerância a amplas faixas de pH, estabilidade química entre pH 2 e 12, inércia frente a biomoléculas, ausência de efeitos deletérios devido a grupos silanóis em sua superfície, facilidade de preparo, grande variedade de monômeros disponíveis com larga faixa de polaridades e facilidade de funcionalização. Contudo, apresentam o problema da utilização de uma faixa limitada de solventes orgânicos. Em geral, a boa estabilidade frente à exposição a soluções alcalinas é um benefício em análises de amostras biológicas, geralmente dissolvidas em soluções básicas. A preparação das FE monolíticas orgânicas comumente consiste em misturar monômeros, um agente de entrecruzamento, um iniciador e agentes porogênicos (solventes) [47].

Até o momento, três tipos diferentes de polímeros foram preparados na forma de monolitos: a) poliacrilamida [48, 49], b) poliestireno-divinilbenzeno [47, 50-53] e c) polimetacrilato [47, 54-58].

### **1.3.3.2. Colunas monolíticas de sílica**

Os monolitos de sílica podem ser preparados por três métodos: a) fusão/sinterização de partículas de sílica, b) entrecruzamento por processo sol-gel de partículas de sílica já prontas e c) polimerização de um reagente alcoxissilano

utilizando o processo sol-gel [44]. Dentre estes métodos, o último é o mais utilizado [59].

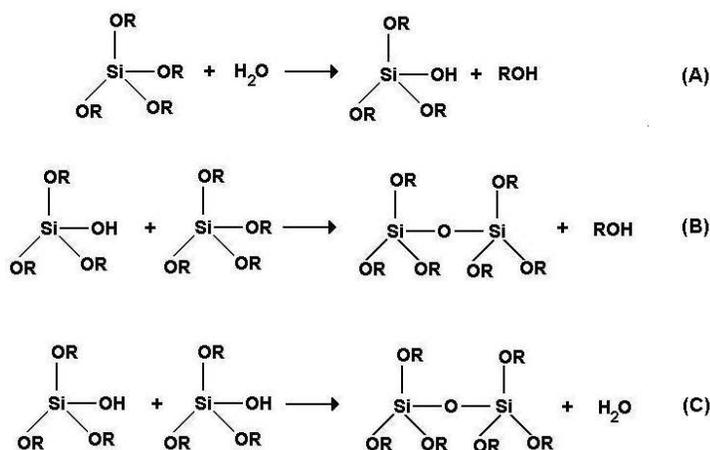
Os monolitos de sílica produzidos pelo processo sol-gel apresentam maior controle na formação dos poros internos, comparados com os monolitos orgânicos, permitindo separações altamente eficientes, especialmente de moléculas pequenas. Porém, eles não podem ser usados com eluentes com valor de pH acima de 8, pois os grupos siloxanos e silanóis da estrutura da sílica reagem nessa faixa de pH, sofrendo dissolução, causando a perda da estrutura monolítica. Em pH menor que 2, o monolito é perdido devido à quebra da ligação Si-C [46].

#### 1.3.3.2.1. Processo sol-gel

Como foi mencionado anteriormente, a principal forma de sintetizar monolitos de sílica é através do processo sol-gel, do qual serão apresentados os aspectos mais importantes.

O processo sol-gel pode ser definido como o crescimento e a agregação de partículas coloidais para formar um gel. O termo **sol** é usado para designar uma suspensão estável de partículas sólidas ou polímeros do tamanho coloidal em um líquido (sendo que o tamanho das partículas do **sol** está entre 1 a 1000 nm). O **gel** consiste de uma contínua rede sólida formada por síis em um líquido. A gelificação (formação de géis) ocorre através da formação de ligações covalentes e é um processo irreversível [60, 61].

O **sol** é obtido através de sucessivas etapas de hidrólise e condensação de silicatos de sódio ou alcoxissilanos em solução. Estes últimos são os precursores mais usados para preparar monolitos de sílica pelo processo sol-gel e sua fórmula genérica é  $\text{Si}(\text{OR})_4$ , onde R é um grupo orgânico (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema das reações do processo sol-gel com alcoxissilanos  $\text{Si}(\text{OR})_4$ . (A) reação de hidrólise, (B) e (C) reações de condensação.

As reações de hidrólise e condensação dos alcoxissilanos somente ocorrem na presença de um catalisador ácido ou básico. Nas reações de hidrólise, tem-se a substituição do grupo alcóxido (OR) do alcoxissilano pelo OH da molécula de água, formando o grupo silanol (Si-OH) e um álcool (Figura 6(A)). Nas reações de condensação, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons livres da hidroxila silanofílica ao átomo de silício de outro alcoxissilano, liberando álcool (Figura 6(B)). Ou o ataque nucleofílico do grupo silanol ao átomo de silício de outro grupo silanol, liberando água (Figura 6(C)). As reações químicas mencionadas ocorrem simultaneamente durante todo o processo de formação do sol, do gel e mesmo depois da formação do gel, no envelhecimento da sílica. O processo de formação do sol encerra quando as partículas atingem um tamanho macroscópico [62].

Os reagentes químicos para a preparação de FE pelo processo sol-gel normalmente incluem: (1) um precursor, que é geralmente um alcóxido  $\text{Si}(\text{OR})_4$  (os mais usados são tetrametoxissilano (TMOS) e tetraetoxissilano (TEOS)) [63], (2) um solvente para dispersar o(s) precursor(es), (3) um catalisador, que pode ser um ácido [64, 65], uma base [66] ou flúor [67,68], dependendo do tipo de produto final desejado, e (4) água. O processo sol-gel também pode ser iniciado por reações radiculares [69-71]. Neste caso, são usados precursores como metacrilóxiopropiltrimetoxissilano (MPTMS) e a reação é iniciada através da aplicação de luz UV (por exemplo, 350 nm) [70].

Na solução **sol**, frequentemente, é usado um agente porogênico, especialmente para a obtenção de um leito poroso monolítico. Os agentes porogênicos desempenham uma dupla função: (a) servem como molde dos poros e (b) como solubilizante do silano. Os porogênicos mais usados são os polióxidos de etileno (POE) de 10 e  $100 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  e o poli(etilenoglicol) (PEG), também com várias massas molares [72].

Em um procedimento típico de preparação de monolitos de sílica pelo processo sol-gel para ECC, TMOS é adicionado a uma solução de PEG -agente porogênico- em água contendo um catalisador apropriado (ácido ou base). A mistura é agitada a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  por um determinado tempo. A solução homogênea resultante é colocada dentro de um capilar de sílica, deixando-a a uma determinada temperatura para que ocorram as reações de hidrólise e policondensação. A primeira etapa é a formação de um **sol**. Em seguida, é convertido em um **gel**, através da policondensação do **sol** levando a uma estrutura úmida. A coluna na forma de gel é então envelhecida por algumas horas, normalmente, na mesma temperatura da reação. A coluna de sílica úmida formada é posteriormente lavada com água e metanol, para formar as estruturas mesoporosas. Sucessivas evaporações, secagem e tratamento térmico são realizados para decompor os constituintes orgânicos e estabilizar a superfície do gel hidrofílico de sílica [32].

#### 1.3.3.2.2. Funcionalização dos monolitos à base de sílica

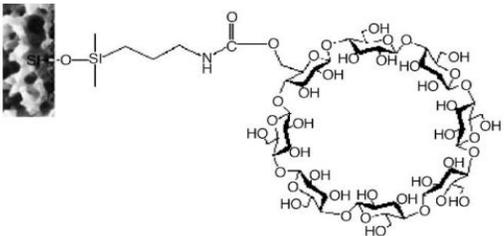
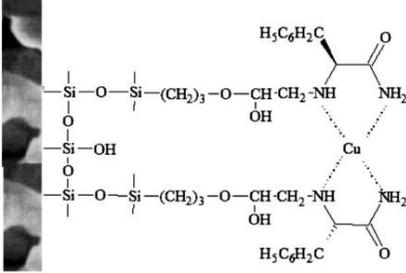
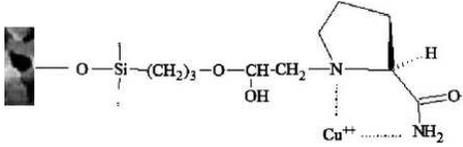
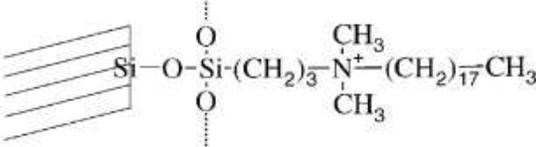
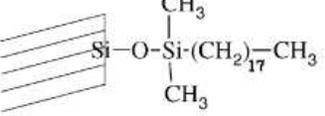
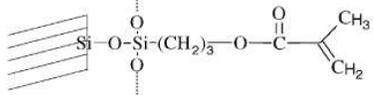
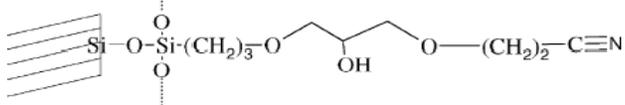
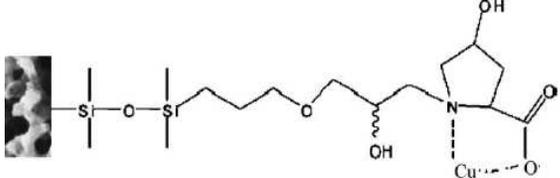
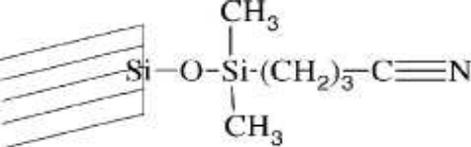
O termo sililação refere-se à fixação na sílica de um composto organosilil, principalmente espécies como trietoxisilil, obtendo-se compostos silanos organofuncionalizados. Os silanos organofuncionalizantes mais utilizados são do tipo bifuncional,  $\text{Y}_3\text{Si-R-X}$ , onde a aplicabilidade da superfície modificada é função do grupo orgânico X, o qual se encontra ligado à cadeia orgânica (R), que geralmente é formada por três grupos metilenos ligados ao átomo de silício. Por outro lado, Y é um grupo reativo (-Cl, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub> ou -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) passível de hidrólise ou reação direta com os grupos silanóis presentes na superfície da sílica.



envolve o procedimento inverso, isto é, ocorre primeiramente a substituição pela molécula desejada, seguido de ancoramento do silano modificado na superfície do suporte. A rota A é a mais utilizada devido às facilidades operacionais, no entanto a rota B é mais fácil e mais precisa no processo de caracterização, levando, inclusive, em muitos casos, a fixação de maior densidade de agentes silitantes numa determinada área da matriz [72].

As fases monolíticas à base de sílica podem ser modificadas pelas rotas descritas anteriormente. Na Tabela 1 são apresentadas algumas das fases presentes na literatura.

**Tabela 1.** Fases estacionárias monolíticas usadas em ECC, adaptada de [71].

 <p>Fase enantiomérica [74].</p>	 <p>Fase enantiomérica [75].</p>
 <p>Fase enantiomérica [76].</p>	 <p>Fase C18 com grupo amino embutido [77,78].</p>
 <p>Fase C18 [79-81]</p>	 <p>Fase polar com interações π [69].</p>
 <p>Fase levemente polar com grupo polar embutido [82,81].</p>	
 <p>Fase enantiomérica [83].</p>	 <p>Fase levemente polar [76].</p>

## 1.4. Fases estacionárias para eletrocromatografia capilar

A concretização do grande potencial de separação de ECC exigiu, e ainda exige, uma solução eficaz a uma série de problemas, principalmente na área de desenvolvimento de FE e da tecnologia de colunas. Na ECC, as FE têm duas funções: (a) como em CLAE, ela interage seletivamente com diversos tipos de moléculas de soluto levando-as a adquirir diferentes velocidades de migração através da coluna e (b) facilita a geração do FEO que é a força motriz para o movimento do eletrólito através da coluna. A magnitude e a direção do FEO dentro da coluna em ECC é determinada pelo valor e pelo sinal da carga elétrica na superfície da FE. Portanto, a concepção, a síntese e a avaliação da FE em ECC apresenta um problema mais complexo do que as técnicas convencionais de separação cromatográficas como cromatografia gasosa (CG) ou CLAE [**Error! Marcador no definido.**].

As separações por ECC têm a sua principal aplicação na análise de compostos neutros, já que envolvem interações entre os analitos e a FE. No entanto, compostos carregados também podem ser analisados e algumas aplicações incluem a separação simultânea de compostos neutros, catiônicos e aniônicos. Para tal fim, as FE em ECC podem ter diferentes mecanismos de separação, como interação hidrofóbica ou hidrofílica, quiral, iônica ou a mistura delas.

### 1.4.1. Fases estacionárias apolares para eletrocromatografia capilar

Assim como em CLAE, a maioria das aplicações das FE ocorre no modo fase reversa (onde a FE é apolar e a FM polar). As fases mais exploradas são do tipo C18, C8 e C4 [12,13, 32].

Ueki *et al.* [84] prepararam várias colunas monolíticas com diferentes tipos de alquilmetacrilatos de hidrofobicidades distintas. Dentre os alquilmetacrilatos, avaliou-se o etilmetacrilato, butilmetacrilato, hexilmetacrilato, laurilmetacrilato e octadecilmetacrilato. Essas colunas foram aplicadas na separação de alquilbenzenos para verificação dos fatores de retenção e da eficiência de

separação. Dentre todas as colunas preparadas, aquela que proporcionou os melhores resultados foi a que possuía octadecilmacrilato como monômero precursor. Na separação de alquilbenzenos, o número de pratos excedeu o valor de 15000 pratos  $m^{-1}$  de coluna. Com a elevação da temperatura para 80 °C, a eficiência de separação excedeu 30000 pratos  $m^{-1}$  de coluna.

Lin *et al.* [85] prepararam colunas monolíticas a partir de octadecilmacrilato, tendo como monômero com carga, para gerar o FEO, o 3-sulfopropilmetacrilato. As colunas foram empregadas na separação de 5 nucleosídeos polares (5'-citosina monofosfato; 5'-guanina monofosfato; 5'-uracila monofosfato; 5'-adenina monofosfato e 5'-tiamina monofosfato).

Karenga e El Rassi [86] estudaram o desenvolvimento de colunas monolíticas neutras a partir do monômero octadecilmacrilato e do agente de entrecruzamento, 3-(trimetoxissilil)propilmetacrilato. A coluna monolítica apresentou um FEO catódico moderado, produzido pela adsorção dos íons provenientes do eletrólito (tampão 1 ou 3 mmol  $L^{-1}$  de  $NaH_2PO_4$ ). Os autores observaram que esta adsorção modulou a retenção dos solutos no monolito e afetou a seletividade de separação. Este estudo foi aplicado na separação de 8 alquilbenzenos, e estes foram separados em menos de 15 min. Também foram separados alquilfenilcetonas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Para nove tipos de fenóis, os autores conseguiram abaixar o tempo de separação de 30 min para menos de 13 min empregando tampão 3 mmol  $L^{-1}$  de  $NaH_2PO_4$  como eletrólito de corrida, e diminuiram o tempo de análise de 30 min para menos de 20 min para oito aminas usando tampão 1 mmol  $L^{-1}$  de  $NaH_2PO_4$ .

Huang *et al.* [87] prepararam colunas monolíticas poliméricas mistas à base de estireno (S), divinilbenzeno (DVB) e lauril metacrilato (LMA) em um só passo de polimerização *in situ* usando várias proporções dos monômeros. As melhores colunas poli(S-DVB) e poli(S-DVB-LMA) foram testadas na separação de cinco antioxidantes sintéticos: propilgalato (PG), galato de octila (GO), butil-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-terbutil-4-metilfenol (BHT) e terbutil-hidroquinona (TBHQ). Os autores conseguiram obter uma separação rápida usando um gradiente de eluição. O método foi aplicado para a determinação dos antioxidantes em óleo

comestível, sendo que a coluna que apresentou melhor desempenho foi a de poli(S-DVB-LMA), apresentando melhor simetria de pico. Os autores observaram que o aumento na quantidade de LMA na coluna poli(S-DVB-LMA) melhorou notavelmente o comportamento de retenção dos antioxidantes (alta simetria e curto tempo de separação).

Chen *et al.* [88] obtiveram uma coluna monolítica porosa à base de éster de polimetacrilato para ECC. A coluna foi sintetizada pela co-polimerização *in situ* de LMA, etilenodimetacrilato (EDMA) e ácido 2-acrilamida-2-metil-1-propanossulfônico (AMPS) em uma mistura ternária de solventes porogênicos incluindo cicloexanol, 1,4 butanodiol e água. Foram separados e analisados quatro flavonóides (rutina, quercetina, kaempferol e quercitrina) para avaliar a coluna monolítica. Os autores conseguiram alta eficiência de separação e rápida análise (3-4 min), utilizando eletrólito contendo tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,0) e acetonitrila 30:70 v/v.

Karenga e El Rassi [89] obtiveram um monolito neutro a base de metacrilato usando o diacrilato de fenileno-naftil (NPM) para separações no modo fase reversa de vários compostos neutros e carregados. A coluna NPM foi preparada pela polimerização *in situ* de naftilmetacrilato como monômero funcional e diacrilato de 1,4-fenileno (PDA) como agente de entrecruzamento, em um sistema ternário de solventes porogênicos contendo dodecanol, cicloexanol e água. A coluna NPM exibiu FEO catódico apesar de ser desprovida de qualquer carga fixa. Os autores observaram que o monolito NPM apresentou maior FEO do que o seu monolito homólogo, NMM, preparado a partir da polimerização *in situ* de naftil trimetacrilato e trimetilolpropano (TRIM). No caso do NMM, acredita-se que o FEO surgiu da adsorção de íons do eletrólito na superfície do monolito. O maior FEO exibido por NPM pode ser atribuído à natureza do diacrilato de 1,4-fenileno (PDA) em comparação com a natureza do trimetilolpropano (TRIM), sugerindo que o PDA tem maior capacidade de ligação de íons do eletrólito devido à sua maior polaridade comparada ao TRIM. Os autores acreditam que a adsorção de íons do eletrólito, juntamente com as interações  $\pi$  adicionais oferecidas pelos anéis aromáticos do NPM, modula a retenção do soluto e a seletividade da separação.

As aplicações da NPM foram demonstradas pela separação de uma gama de solutos pequenos e grandes, incluindo peptídeos, peptídeos trípticos e proteínas.

Huang *et al.* [90] prepararam uma série de FE monolíticas de poli(metacrilato de alquildivinilbenzeno) por uma única etapa de polimerização *in situ* de divinilbenzeno e vários metacrilatos de alquila (butil, octil ou lauril). Os autores testaram as colunas na separação de compostos derivados da benzofenona. Além disso, observaram que, com um aumento no comprimento molecular do metacrilato de alquila, o monolito polimérico apresentou maior hidrofobicidade, reduzindo as caudas dos picos e a retenção das benzofenonas. Conseqüentemente, o tempo de retenção dos compostos aromáticos foi marcadamente reduzido com o aumento do comprimento da cadeia de carbono do metacrilato de alquila. Comparando estudos anteriores com colunas à base de poliestireno, que apresentavam problema de cauda nos picos, a diminuição dos grupos benzenos na FE resultou na redução da assimetria dos picos. Neste estudo, os autores demonstraram que a retenção indesejável (cauda de pico) também pode ser diminuída através da inclusão de metacrilato de alquila de cadeia longa na composição das colunas à base de poliestireno.

Lin *et al.* [91] prepararam uma coluna monolítica capilar neutra do tipo C18 que foi avaliada como FE hidrofóbica no sistema ECC pressurizado para solutos neutros, ácidos e básicos. O monolito foi preparado por copolimerização *in situ* de octadecilmetacrilato e etilenodimetacrilato em um solvente porogênico binário consistindo de cicloexanol e 1,4-butanodiol. O FEO nesta coluna monolítica hidrofóbica foi baixo, mesmo quando o valor do pH do eletrólito era elevado. Devido à ausência de cargas fixas, a estrutura monolítica formada estava livre de interações eletrostáticas com solutos carregados. As separações de solutos neutros foram baseadas no mecanismo de interações hidrofóbicas tendo a pressão como força motriz. Os solutos ácidos e básicos foram separados em modo ECC pressurizado (pECC) e a mobilidade eletroforética como força motriz, sendo que os analitos básicos apresentaram picos simétricos. A seletividade de separação de solutos carregados está baseada em suas diferenças de mobilidade eletroforética e interação hidrofóbica com a FE. Sob condições otimizadas, a

coluna apresentou eficiências de 82000 pratos  $m^{-1}$  para compostos neutros, 134000 pratos  $m^{-1}$  para os compostos ácidos e 150000 pratos  $m^{-1}$  para compostos básicos.

Wu *et al.* [92] propuseram um novo método analítico de pECC com detecção amperométrica indireta para a determinação de alguns pesticidas organofosforados (POF) não eletroativos. Os autores usaram 0,1 mmol  $L^{-1}$  de 3,4-dihidroxibenzilamina adicionada à FM, composta de ACN:tampão ácido (2-N-morfolino)etano sulfônico (MES) (10 mmol  $L^{-1}$ , pH 5,5) 50:50 v/v e 0,9 V (Ag / AgCl) de potencial de trabalho, para obter os níveis máximos de sinal dos analitos. A tensão de separação de 10 kV, a pressão da coluna de 7,0 MPa e a vazão da bomba de 0,05 mL  $min^{-1}$  foram selecionadas como condições ideais para a separação de seis POF (dimetoato, metil paration, etil paration, clorpirifós, metil clorpirifós, triclorfon). Os POF foram separados em 15 min e os limites de detecção variaram entre 0,008 e 0,2 mg  $kg^{-1}$ . Para a extração dos pesticidas em amostras de vegetais e frutos foi empregada a técnica de extração em fase sólida, com média de recuperação entre 78,9% e 87,2% para as amostras de vegetais e 81,4% a 98,6% para as amostras de frutos.

Wu *et al.* [93] desenvolveram um método por ECC com pressão auxiliar e detecção por fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês *laser-induced fluorescence*), para a separação e determinação de flavinas no plasma humano. Com uma coluna monolítica a base de metacrilato com grupos sulfato e n-octadecil, os autores conseguiram a separação em modo isocrático dos analitos com picos simétricos. A separação de riboflavina (RF), mononucleotídeo de flavina (FMN) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) foi alcançada em 4,5 min, em um eletrólito contendo acetonitrila:20 mmol  $L^{-1}$  tampão fosfato (pH 4,0), 60:40 (v/v), com -22 kV de tensão aplicada, 290 psi de pressão auxiliar e 0,02 mL  $min^{-1}$  de vazão. Usando um laser de diodo de 473 nm, as flavinas foram determinadas por LIF com limite de detecção de 0,5 nmol  $L^{-1}$ .

Wu *et al.* [94] sinterizaram uma coluna monolítica de sílica com grupos cloropropil através do processo sol-gel utilizando TMOS e 3-cloropropil-trimetoxissilano (CPTMS) como precursores. O monolito híbrido resultante

apresentou morfologia de macroporos homogêneos. Os autores aproveitaram a alta reatividade química dos grupos cloro incorporados na matriz de sílica para modificá-los com uma amina terciária de N,N-dimetil-N-dodecilamina (DMDA). A coluna híbrida monolítica resultante C12 não só demonstrou propriedades hidrofóbicas na separação de alquilbenzenos, em fase reversa ECC, mas também FEO em uma ampla faixa de pH. Cinco alquilbenzenos foram separados em 3 min com a eficiência da coluna variando de 189700 a 221000 pratos  $m^{-1}$ .

Hu *et al.* [95] relataram uma nova estratégia para funcionalizar colunas capilares tubulares abertas através de adsorção iônica de nanopartículas de ouro (AuNP) em um capilar com parede modificada com multicamadas de polieletrólito. O revestimento foi realizado *in situ*, alternando lavagens de compostos com carga positiva como poli(cloreto de dialildimetilamônio), carga negativa, poli (4-estireno de sódio) e AuNP carregadas positivamente. Em seguida, as AuNP foram recobertas de n-octadecanotiol. Os autores compararam várias configurações da coluna e encontraram que o melhor desempenho cromatográfico foi obtido na coluna revestida com AuNP carregadas positivamente. O revestimento foi robusto, sendo que mais de 810 corridas foram realizadas. A FE mostrou alta estabilidade em 0,01 mol  $L^{-1}$  de NaOH e 0,01 mol  $L^{-1}$  de HCl, com concentrações de eletrólitos de até 70 mmol  $L^{-1}$ . Os autores observaram que a repetitividade entre corridas, dia-a-dia, e de FEO de capilar-a-capilar tinham valores satisfatórios de desvio padrão, menores que 1% em todos os casos. O capilar modificado foi aplicado na separação de analitos neutros (naftaleno, bifenil e tioureia) e proteínas e enzimas (ovomucóide, lisozima, biotina, ovotransferrina e ovoalbumina).

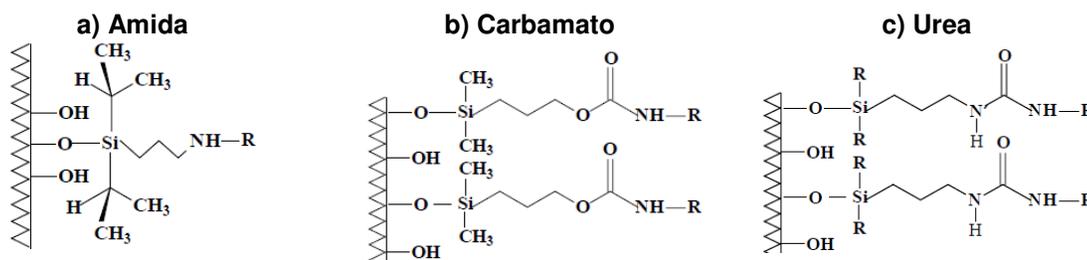
Chen *et al.* [96] prepararam uma coluna tubular aberta com camadas porosas de polímero a partir de butilmetacrilato (BMA), um monômero ionizável, succinato de mono-(2-metacrilóilóxieta) (SME) e um agente reticulante (dimetacrilato de etileno). Além disso, os autores usaram um capilar de sílica modificado com uma monocamada de SME (identificada como SIH-SME, as siglas SIH são para indicar que o polímero está diretamente ligado à superfície de sílica) para comparar com a coluna BMA-SME. E, ainda, aperfeiçoaram as condições de separação por ECC para cada grupo de analitos (nucleosídeos e timina,

flavonóides e ácidos fenólicos). A comparação da seletividade da separação entre as colunas capilares BMA-SME e SIH-SME dos analitos foi feita de acordo com a velocidade e os fatores de retenção. Em geral, as separações na fase BMA-SME tiveram melhor resolução do que a fase SIH-SME.

#### 1.4.2. Fases estacionárias com grupo polar embutido para eletrocromatografia capilar.

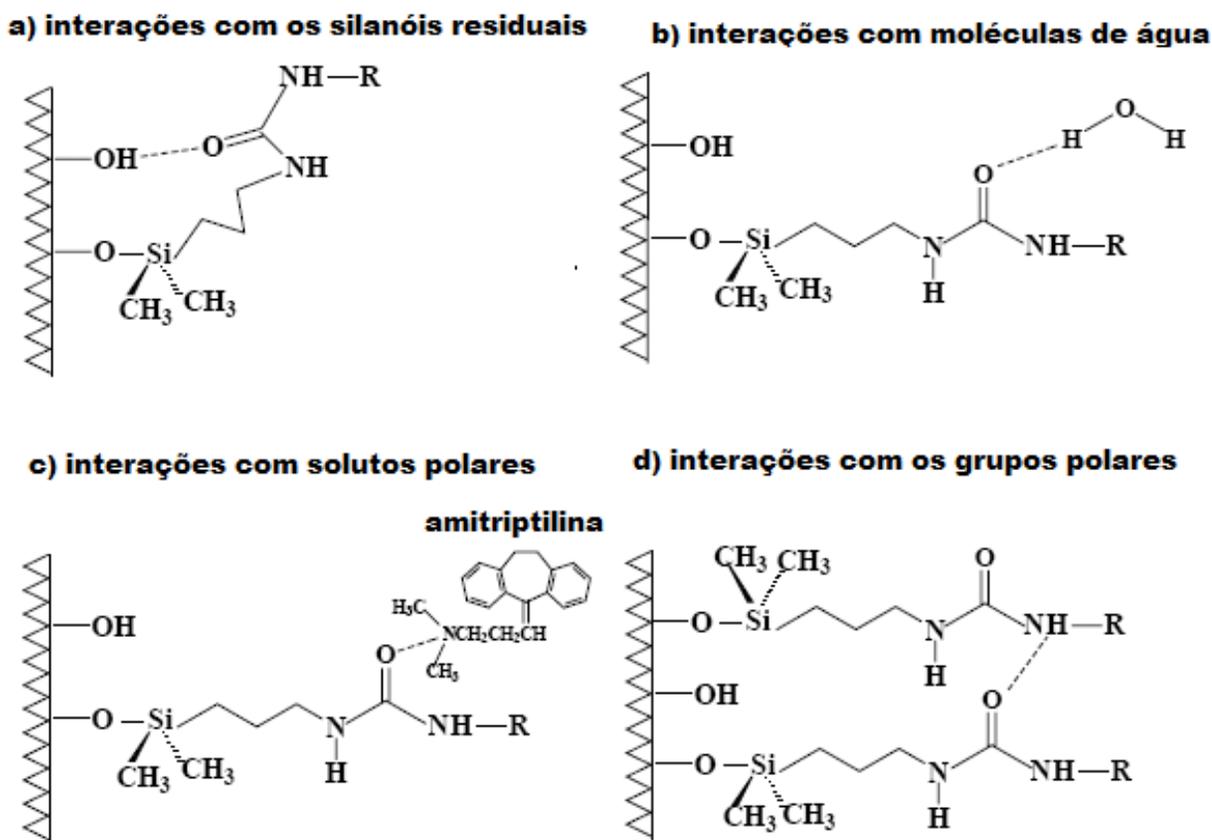
As fases estacionárias apolares em ECC são as fases mais empregadas devido à sua capacidade de reter e resolver uma ampla gama de compostos hidrofóbicos e ligeiramente polares [97, 98]. No entanto, os analitos altamente polares e básicos são difíceis de serem separados nas FE à base de sílica tradicionais, porque grupos silanóis reativos das FE muitas vezes resultam em interações secundárias com os compostos básicos, que levam a um alargamento de pico e ao aumento na retenção. O uso de FE capeadas à base de sílica geralmente é considerado impróprio para ECC, já que os grupos silanóis sem derivatizar são essenciais para a geração do FEO. Além disso, soluções aquosas de eletrólitos empregadas, como FM, são necessárias para a separação de compostos altamente polares. As FM altamente aquosas, combinadas com as FE apolares, geralmente levam à formação de bolhas e à interrupção do processo de separação [99].

Uma das novas tendências para a obtenção de FE reversas em CLAE é o uso de um agente sililante contendo um grupo polar embutido na cadeia n-alquila. Este grupo pode ser do tipo amida [100], ureia [101] ou carbamato [102] (Figura 9).



**Figura 9.** Estrutura química de uma fase com grupo polar embutido, onde R pode ser uma cadeia de 3 a 17 carbonos.

A presença destes grupos na FE confere-lhe certa estabilidade, já que estes podem interagir com os grupos silanóis da sílica por meio de ligação de hidrogênio [103] (Figura 10). A preparação dos agentes sililantes contendo grupos polares do tipo ureia inseridos na cadeia n-alquila foi proposta por Silva *et al.* [101, 104-107].



**Figura 10.** Interações das fases com grupo ureia embutido e a) silanóis residuais, b) moléculas de água, c) solutos polares e d) entre os próprios grupos polares. Adaptado de [103].

Assim como em CLAE, é esperado que a fase com grupo polar embutido apresente um melhor desempenho na separação de compostos básicos e polares do que a fase tradicional à base de sílica em ECC.

Separações aceitáveis em ECC foram obtidas com estas FE e estão descritas na literatura. Progent e Taverna [108] relataram o uso de uma FE à base de sílica tendo um grupo amônio quaternário catiônico embutido em uma cadeia alquílica C21, usada para separar peptídeos.

Ye *et al.* [109] sintetizaram uma coluna de sílica monolítica com um grupo amino polar embutido vinculado a uma cadeia alifática de 16 átomos de carbono (C16). Esta coluna foi usada no modo fase reversa na separação de solutos neutros, básicos e polares. Além disso, os autores realizaram uma comparação do desempenho entre a coluna com o grupo polar embutido e uma coluna C16 sem o grupo polar. Os autores demonstraram que a coluna monolítica com o grupo amino apresentou redução na retenção de analitos com características hidrofóbicas na separação de cinco compostos n-alkilbenzenos e quatro fenóis, quando comparada com a coluna monolítica de sílica hexadecil. Também observaram uma atividade de silanóis residuais menor na coluna com grupo polar quando feita a separação da mistura teste contendo compostos básicos, incluindo quatro aminas aromáticas, atenolol e metoprolol com  $10 \text{ mmolL}^{-1}$  tampão borato (pH 7,5):ACN 70:30 v/v como FM.

Ding *et al.* [110] prepararam uma coluna monolítica a base de sílica com grupos octilaminopropil ligados à superfície. Os autores confirmaram o comportamento cromatográfico de fase reversa da coluna com solutos apolares (por exemplo, alquilbenzenos) com eficiência de  $280000 \text{ pratos m}^{-1}$  para o butilbenzeno. Os autores observaram que quando o pH do tampão aumentou, o FEO passou de  $-2,65 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  (pH 3,0) para  $+1,20 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (pH 8,0), com a reversão do FEO em torno de pH 6,4. Usando FM ácida, cinco ácidos aromáticos foram separados eficientemente em menos de 6 min. Para os compostos básicos, picos simétricos foram obtidos devido à existência do grupo amida hidrofílico, que pode reduzir efetivamente a adsorção dos analitos básicos carregados positivamente na superfície à base de sílica da coluna monolítica capilar.

### 1.4.3. Fases estacionárias polares para eletrocromatografia capilar

As primeiras fases polares usadas em ECC foram os monolitos de sílica [111], mas, recentemente, os monolitos orgânicos têm sido preparados para a separação de compostos básicos e proteínas, entre outros.

Svec *et al.* [112] prepararam colunas monolíticas capilares com nanopartículas de hidroxiapatita. As nanopartículas de hidroxiapatita em forma de bastão foram incorporadas ao monolito poli(2-hidroxietilmetacrilato-co-dimetacrilato de etileno) simplesmente adicionando-os na mistura dos monômeros precursores seguido por polimerização *in situ*. O efeito da porcentagem de monômeros e nanopartículas de hidroxiapatita na mistura de polimerização sobre o desempenho da coluna monolítica foi estudado em detalhes. Os autores descobriram que as interações do monolito com os analitos eram relacionadas às características da hidroxiapatita. Os autores obtiveram as melhores separações com as colunas com maior carga de hidroxiapatita. As colunas monolíticas foram testadas na separação de uma mistura teste de proteínas, incluindo ovoalbumina, mioglobina, lisozima e citocromo c.

Wang *et al.* [113] prepararam uma FE monolítica para ECC com modo misto de interações hidrofílicas e troca iônica forte (SCX, do inglês *strong cation-exchange*) pela copolimerização *in situ* de pentaeritritoltriacrilato (PETA), N,N-dimetil-N-metacriloxietil-N-(3-sulfopropil) betaína de amônio (DMMSA) e amina quaternária acrílica como monômero seletor. Os autores justificaram a adição da amina quaternária acrílica para controlar a magnitude do FEO e para fornecer os sítios de troca iônica. Por tal motivo, os autores testaram três diferentes monômeros de amônio quaternário acrílicos ([2-(acrilóiloxi)etil]trimetilamônio metilsulfato, [2-(metacrilóiloxi)etil] trimetilamônio metilsulfato e 2-(metacrilóiloxi)etil trimetilamônio cloreto) para atingir a velocidade máxima de FEO. O monolito otimizado obteve uma boa separação para uma gama de analitos polares, incluindo nucleotídeos, bases de ácidos nucléicos e nucleosídeos, fenóis, estrógenos e pequenos peptídeos. As eficiências obtidas foram de 192000 pratos  $m^{-1}$  para o estriol e 135000 pratos  $m^{-1}$  para citidina ionizada.

Stege *et al.* [114] realizaram um estudo para a implementação de um novo método para determinação de melatonina em matrizes alimentares complexas usando ECC com uma coluna capilar tubular aberta contendo como FE nanotubos de carbono de paredes múltiplas e grupos carboxílicos imobilizados. O método foi aplicado na determinação de melatonina em vinho tinto e branco, pele de uva e

extratos de plantas de *Salvia officinalis* L. Os resultados indicaram alta resolução dos compostos, boa eficiência e maior detectabilidade comparado com capilares convencionais. Além disso, foi demonstrado resultados altamente reprodutíveis entre as corridas, entre os dias e entre as colunas. O limite de detecção (LD) para melatonina foi de  $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Chen *et al.* [115] prepararam uma coluna capilar tubular aberta com uma nova fase imobilizada contendo nanotubos de carbono (CNT). A coluna foi preparada pela polimerização *in situ* de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, tratados com ácido ( $\text{HNO}_3$   $3,0 \text{ mol L}^{-1}$  por 24 h a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e, depois, com  $\text{HCl}$   $5,0 \text{ mol L}^{-1}$  por 6 h a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ), usando BMA como monômero precursor e etilenodimetacrilato como agente reticulante em um capilar previamente silanizado. Os autores observaram que a incorporação dos CNT na matriz do polímero pode aumentar a quantidade de FE recobrindo o capilar de sílica com a vantagem da facilidade de preparo da coluna. A coluna BMA-CNT foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as imagens confirmaram o ancoramento da FE. A análise por espectroscopia de infravermelho (IV) usando reflectância total atenuada permitiu a identificação dos grupos carbonila formados nos nanotubos pela reação com ácido e, posteriormente, a observação do aumento do pico do grupo carbonila após a polimerização. Os autores também caracterizaram a fase com as medidas de FEO, variando o pH e o volume de modificador orgânico. Na estrutura de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, os grupos carboxilatos foram os principais grupos ionizáveis na superfície da fase, influenciando o FEO com uma mobilidade eletrosmótica de  $4,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 2,8 e valores de desvio padrão relativo (DPR) para a mobilidade ( $n=5$ ) de 3,2%, 4,1% e 4,3%, para três capilares diferentes a pH 7,6. Os autores aplicaram a coluna BMA-CNT em separações ECC de várias amostras, incluindo bases nucleotídicas, nucleotídeos, flavonóides e ácidos fenólicos.

Zhang *et al.* [116] prepararam uma coluna tubular aberta modificada com 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propiltrimetoxissilano. Os autores observaram que os grupos funcionais hidrofílicos triamina ligados à coluna tubular aberta têm

capacidade de gerar tanto FEO anódico como catódico. Quando o pH do eletrólito de corrida foi menor que 5,3, o FEO anódico esteve presente, impedindo a indesejada adsorção de proteínas básicas no interior da parede capilar. A separação de quatro proteínas básicas (tripsina, ribonuclease A, lisozima e citocromo c) foi alcançada com êxito, em pH 3,5 e usando 10 mmol L<sup>-1</sup> tampão fosfato. As eficiências de separação de proteínas na coluna estavam na faixa de 87000-110000 pratos m<sup>-1</sup>, e os valores de DPR para tempo de migração de quatro proteínas foram inferiores a 1,2% (entre corridas, n = 55). Os analitos iônicos também foram separados de forma eficiente no modo coeletrosmótico. As eficiências médias variaram de 81000 a 190000 pratos m<sup>-1</sup> para sete ácidos aromáticos e 186000 a 245000 pratos m<sup>-1</sup> para quatro nucleosídeos mono-fosfato, respectivamente.

#### **1.4.4. Fases estacionárias de troca iônica para eletrocromatografia capilar.**

As FE de troca iônica para ECC têm sido amplamente estudadas e aplicadas tanto como trocadoras aniônicas quanto trocadoras catiônicas, em separações enantioméricas e em separações de ânions e cátions. Há diversas FE de troca iônica, sendo a maioria delas com mais de um grupo funcional para explorar a seletividade das mesmas.

Breadmore *et al.* [117] desenvolveram uma FE com aplicação em microchip. Os autores realizaram a derivatização da fase pela cobertura dinâmica do monolito com o polímero catiônico cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDAC), sendo avaliada também a formação dos poros pela variação da massa molar do PEO adicionado na mistura reacional. Os mesmos autores continuaram o aperfeiçoamento destas fases monolíticas recobertas com polímeros trocadores de íons em outro trabalho [118]. Neste segundo artigo são apresentadas fases recobertas dinamicamente com camadas de polieletrólitos de PDDAC e dextran sulfato, as quais apresentaram maior estabilidade, além da possibilidade de uso da fase como trocadora catiônica, para separação de peptídeos. Outro polímero testado foi o poli(estireno-*p*-sulfonato de sódio) (PSS), o qual apresentou melhor

desempenho na separação dos peptídeos em relação a coluna recoberta com PDDAC, devido à maior retenção.

Yan *et al.* [119] publicaram um trabalho onde foi desenvolvida uma fase monolítica trocadora fraca de ânions para a separação de 8 ácidos orgânicos, obtendo uma eficiência de 276000 pratos  $m^{-1}$ . A fase foi obtida pela adição do agente sililante (3-aminopropiltrióxissilano, APTMS) à mistura reacional composta de TEOS, etanol, água e brometo de cetiltrimetilamônio.

Hilder *et al.* [120] fizeram a determinação de 8 ânions inorgânicos ( $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $I^-$ ), usando uma coluna recheada com uma FE trocadora aniônica comercial (Dionex AS9-SC). Os autores compararam a detecção condutométrica sem contato ( $C^4D$ , do inglês *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*) com detecção indireta por UV e observaram que, para os ânions estudados, a detecção  $C^4D$  obteve melhor desempenho.

Tang e Lee [121] prepararam uma coluna monolítica de modo misto do tipo C18 e SCX e compararam os parâmetros obtidos para esta coluna com os obtidos para uma coluna monolítica C18. Os autores concluíram que as colunas com fase mista apresentavam maior FEO em baixos valores de pH e uma estabilidade maior entre pH 2 e 9, além de evitar a formação de bolhas.

Hutchinson *et al.* [122] prepararam uma fase trocadora aniônica usando monólitos de sílica como suporte de partículas de látex funcionalizadas com amina quaternária. Os autores compararam os parâmetros característicos destas fases com capilares de sílica vazios e com colunas tubulares abertas. Os resultados mostraram maior retenção para as colunas monolíticas e valores de 80000 pratos  $m^{-1}$  para colunas de 25 cm de comprimento e 50  $\mu m$  de diâmetro interno. Não obstante, foram encontrados problemas relacionados com a geração de calor e à retenção dos analitos.

Ríordáin *et al.* [123] desenvolveram colunas monolíticas de sílica revestidas com o surfactante N-dodecil-N,N-(dimetilamônio)undecanoato, o qual permitiu obter uma fase *zwitteriônica* (dependendo do valor de pH, a fase pode atuar como trocador aniônico ou catiônico) para ECC. Os autores testaram a separação de ânions inorgânicos estudando o efeito do pH sobre a retenção dos ânions e o uso

de gradientes de eluição para otimizar as separações. Os eletrocromatogramas mostraram uma separação rápida (6 min) para 7 ânions e valores de eficiência de 29000 pratos  $m^{-1}$  para colunas de 2,5 cm de comprimento e 42000 pratos  $m^{-1}$  para colunas de 10 cm.

Huang *et al.* [124] prepararam um monolito de sílica poroso zwitteriônico pela ligação covalente *in situ* de lisina com um monolito de sílica modificado com  $\gamma$ -glicidoxipropiltrimetoxissilano. Os autores realizaram separações de solutos neutros e ionizados por pECC. Foi observado que a fase monolítica foi capaz de separar nucleotídeos a partir de interações hidrofílicas e eletrostáticas entre a FE e os analitos. Além disso, as propriedades de separação do monolito zwitteriônico foram comparadas às de um monolito de sílica modificado com diamina como FE. O monolito de lisina apresentou menor retenção para os cinco nucleotídeos, o qual, segundo os autores, é devido à dissociação dos grupos externos de ácidos carboxílicos, os quais originaram a repulsão eletrostática com os solutos carregados negativamente. Sob as mesmas condições experimentais, a separação de cinco nucleotídeos na coluna zwitteriônica levou menos de 8 min, enquanto que na coluna de diamina levou quase 60 min.

### 1.5. Parâmetros de avaliação de colunas e fases estacionárias em eletrocromatografia capilar

Analogamente aos parâmetros utilizados em CLAE para avaliar o desempenho das colunas, alguns autores [125] utilizam alguns parâmetros cromatográficos para avaliar as colunas capilares de ECC. Estes parâmetros são calculados a partir de resultados experimentais.

Um deles é o **fator de retenção (k)** dado pela equação 8.

$$k = (t_a - t_{FEO}) / t_{FEO} \quad \text{Eq. 8}$$

onde  $t_a$  é o tempo de migração do analito e  $t_{FEO}$  é o tempo de migração do FEO, determinado pela injeção de um analito neutro que não apresenta interação com a FE, chamado de marcador de fluxo.

O outro parâmetro é a **eficiência**, que é medida pelo número de pratos (N):

$$N = 5,545((t_a)/(w_{1/2}))^2 \quad \text{Eq. 9}$$

onde  $w_{1/2}$  é a largura do pico a meia altura.

A **altura do prato (H)** é a razão entre o comprimento da coluna (L) expressa em metros e o número de pratos (N) e pode ser calculada por

$$H = L/N \quad \text{Eq. 10}$$

A **resolução** entre dois solutos (R) pode ser calculada pela equação 11.

$$R = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2) \quad \text{Eq. 11}$$

onde  $t_2$  é o tempo de migração do componente 1, em s;  $t_1$  é o tempo de migração do componente 2, em s;  $w_1$  é a largura do pico do componente 1, em s;  $w_2$  é a largura do pico do componente 2 em s.

# **CAPÍTULO 2**

## **JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**



## 2.1. Justificativas

No capítulo 1 foram apresentados diversos aspectos em ECC. Estes deixam em evidência que a tecnologia de colunas é um tópico importante explorado nas pesquisas da área, as quais visam atingir as vantagens que a técnica oferece.

Existem alguns pontos que devem ser aperfeiçoados nas pesquisas para a elaboração de cada tipo de coluna para ECC. Deste modo, na pesquisa com as colunas recheadas ou particuladas devem melhorar a reprodutibilidade no preparo do leito e a fabricação dos filtros para conter a fase estacionária dentro do capilar. Além disso, deve-se diminuir a fragilidade das colunas que podem quebrar nas pontas ou na janela de detecção. Já as pesquisas com colunas tubulares abertas devem visar melhorar a baixa capacidade de amostragem e a fragilidade na janela de detecção. Nas pesquisas com colunas monolíticas, os pontos críticos a ser estudados são a falta de reprodutibilidade no leito da coluna, bem como a fragilidade da coluna na janela de detecção.

Outro aspecto importante a ser estudado nas fases estacionárias para ECC são os grupos funcionais, os quais devem proporcionar não somente seletividade, mas também sustentação do FEO e permitir a separação de compostos sem os efeitos indesejados de alargamento de pico.

No presente trabalho foi proposta a síntese de um agente sililante com um grupo ureia embutido em uma cadeia polar, aplicado na funcionalização de uma coluna monolítica de sílica para ECC. As colunas capilares monolíticas foram selecionadas porque são as que apresentam menores desvantagens em relação às colunas recheadas e às colunas recobertas. Os monolitos à base de sílica foram escolhidos devido à alta estabilidade mecânica e térmica, à rigidez deste material, à necessidade de baixas pressões para o condicionamento ( $\approx 100$  psi) e à facilidade de funcionalização.

Para superar o problema da fragilidade da coluna na janela de detecção foi dispensada a formação desta, empregado um detector  $C^4D$  ou uma cela comercial de alta sensibilidade, no caso de detecção UV.

## 2.2. Objetivos

O principal objetivo do trabalho foi sintetizar e caracterizar uma nova fase estacionária monolítica, para eletrocromatografia capilar, baseada no processo sol-gel, contendo grupo polar do tipo ureia embutido na cadeia orgânica e com características trocadoras de cátions. Para atingir este objetivo, foram cumpridas as seguintes etapas:

- ♥ Preparar colunas capilares monolíticas baseadas no processo sol-gel.
- ♥ Preparar um agente sililante do tipo alcoxissilano, contendo grupo polar tipo ureia inserida na cadeia orgânica, com grupo terminal ácido carboxílico.
- ♥ Modificar a superfície do monolito com o agente sililante.
- ♥ Caracterizar o agente sililante, o monolito de sílica e a nova fase estacionária por testes físicos e eletroforéticos.
- ♥ Avaliação da nova fase estacionária na separação de cátions, compostos neutros e básicos.

# **CAPÍTULO 3**

## **PARTE EXPERIMENTAL**



### 3.1. Materiais e reagentes.

Os materiais e reagentes empregados neste trabalho foram: hidróxido de sódio (Synth); ácido clorídrico (Synth); ácido nítrico (Synth); tetrahidrofurano (Synth); hexano (Synth); ácido acético (Mallinckrodt); água deionizada tipo Milli-Q; polietilenoglicol,  $10000 \text{ g mol}^{-1}$  (Sigma); ureia (Riedel-deHaën); metanol grau CLAE (J. T. Baker); trietilamina (Aldrich); trietoxipropilisocianatossilano (Aldrich); tetrametoxissilano (Merck); tampão fosfato (Merck); N,N-dimetilformamida (Aldrich); ácido 4-aminobenzóico (Aldrich); tetraetoxissilano (Fluka); ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico (Arginina; Sigma Aldrich 99%); ácido 2-amino-3-imidazolpropiónico, (Histidina, Sigma Aldrich 99%); ácido 2,6-diaminoexanóico (Lisina, Sigma Aldrich 99%); tampão tris(hidroximetil)aminometano (Fluka); etilbenzeno (Fluka); propilbenzeno (Fluka); butilbenzeno (Fluka); pentilbenzeno (Fluka); tioureia (Riedel-deHaën); metilparabeno (Aldrich); etilparabeno (Aldrich); propilparabeno (Aldrich); butilparabeno (Aldrich); acetonitrila (J. T. Baker); cloreto de amônio (Ecibra); cloreto de cálcio (Merck); cloreto de potássio (Synth); cloreto de sódio (Synth). Também foram utilizados capilares de sílica fundida recobertos com poliimida com 100, 75 e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (Agilent); seringas de vidro e polietileno de 1, 3 e 5 mL; seringas para insulina de 0,5 mL com agulha integrada de 8 mm e 0,3 mm de calibre, e adaptadores tipo luvas para capilares (*Micro Tight sleeve orange* 0,013 x 0,025 e *Micro Tight sleeve green* 0,0155 x 0,025, Upchurch).

### 3.2. Equipamentos

Forno de cromatógrafo a gás modelo 5890A (Hewlett Packard), forno tunel com programador de temperatura modelo FT 20 (EDG equipamentos); bomba de CLAE modelo 515 (Waters); bomba seringa modelo 260D (Isco); bomba seringa (Kd Scientific); microscópio ótico modelo BA300 (Miotic); microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6360LV (Jeol); analisador elementar modelo 2400 (Perkin-Elmer); analisador de área superficial e volume de poros modelo 2010

(Micrometrics); espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier MB-100E (Bomem); espectrômetros de ressonância magnética nuclear 250 MHz Avance (Bruker) e Inova (Varian); espectrômetros de massas AutoSpace híbrido EBE (Micromass) e Xevo Q-TOF (Waters).

### 3.2.1. Equipamentos de eletroforese capilar

Para as avaliações eletroforéticas das fases estacionárias com detecção  $C^4D$  foram usados três equipamentos, designados como sistemas 1, 2 e 3.

➤ Os sistemas 1 e 3 consistem em equipamentos de eletroforese capilar, construídos pelo Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP) [126]. Esses sistemas são constituídos por fonte de alta tensão (30 kV), capilares de sílica fundida, eletrodos de platina e detector. O detector condutométrico sem contato foi posicionado a 10 cm do final do capilar. Dois eletrodos tubulares de 2 mm, espaçados por 1 mm, foram posicionados do lado externo do capilar. A camada de poliimida não foi removida dos capilares da região de detecção. Um sinal senoidal entre 453 e 555 kHz e baixa amplitude (1,3 –3,1 V<sub>p</sub>) foi aplicado sobre um dos eletrodos com auxílio de um gerador de sinais (Minipa UFG-4202, Brasil). O outro eletrodo foi conectado ao circuito eletrônico do detector com etapas de conversão corrente-tensão, retificação e amplificação. O sinal contínuo resultante foi coletado a partir de uma interface A/D (Ni-USB-6009, National Instruments, USA). Os dados do detector foram armazenados em computador com auxílio de software de controle escrito em Labview 7.1 Student edition, sob plataforma Windows XP.

➤ O sistema 2 é um equipamento comercial Waters Capillary Ion Analyzer que foi adaptado com um detector condutométrico sem contato. Este equipamento está conectado a um computador para aquisição de dados e software de controle escrito em Labview 7.1 Student edition, sob plataforma Windows.

Para as avaliações eletroforéticas com detecção UV foi usado um equipamento de Eletroforese Capilar HP3D (Agilent Technologies) equipado com

detector de arranjo de diodos e um computador para aquisição de dados e software ChemStation (2001-2007).

### **3.3. Preparação do monolito de sílica**

#### **3.3.1. Pré-tratamento do capilar**

Antes de preparar o monolito de sílica, foi realizado um pré-tratamento no interior do capilar de sílica fundida para eliminar as impurezas da superfície interna e deixá-la com o maior número de grupos silanóis disponíveis para participar das reações de formação do monolito no processo sol-gel. Este procedimento permite ancorar a fase monolítica ao capilar.

Com auxílio de uma seringa de plástico (1 mL), o capilar foi lavado e preenchido (L= 60 cm; 50, 75 ou 100  $\mu\text{m}$  de d.i.) com solução 1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, selado com conectores de vidro e colocado no forno a 95 °C por 2 h. Em seguida, o capilar foi lavado com água deionizada tipo Milli-Q até meio neutro, deixado em fluxo de N<sub>2</sub> por 15 min e colocado aberto no forno a 120 °C por 2 h.

#### **3.3.2 Mistura reacional do monolito de sílica**

A mistura reacional do monolito de sílica foi adaptada da proposta de Tanaka *et al.* [127]. Em um béquer de 10 mL, mantido em banho de gelo, adicionou-se 2 mL de solução 0,01 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético. Uma vez estabilizada a temperatura da solução a 0 °C, colocou-se 0,1769 g de polietilenoglicol (PEG) e agitou-se a mistura até ficar homogênea. Adicionaram-se 0,1808 g de ureia e continuou-se a agitação até obter uma mistura totalmente homogênea. Por último, foram adicionados 0,8 mL de TMOS e, a partir desse momento, a temperatura (0 °C) e a agitação foram mantidas constantes por 45 min. Foi realizada uma variação desta mistura reacional adicionando 1,2 mL de TEOS em substituição ao TMOS.

O capilar foi preenchido com a mistura reacional, fechado com um conector, como ilustra a Figura 11, e aquecido no forno a 40 °C por 18 h ou 25 h.

Posteriormente, aumentou-se a temperatura do forno para 120 °C e manteve-se por 3 h. O capilar foi lavado com água e metanol e deixado novamente no forno de CG ou na mufla, com uma rampa de temperatura de 40 °C a 330 °C, a uma velocidade de 5 °C min<sup>-1</sup>, na qual permanecia por 25 h.



**Figura 11.** Fotos do conector empregado para fechar os capilares de sílica durante os tratamentos térmicos.

Uma vez formado o monolito, sua superfície era ativada para permitir um melhor recobrimento com o reagente de funcionalização. Para isso, a coluna foi lavada com HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e água até obtenção de um sistema próximo a neutralidade e colocada no forno a 120 °C por 1 h.

### **3.4. Caracterização do monolito de sílica**

#### **3.4.1. Microscópio óptico**

O preenchimento das colunas monolíticas ao longo do capilar foi avaliado com o auxílio do microscópio óptico. Com este procedimento foi possível descartar as colunas que não estavam totalmente preenchidas ou que apresentavam muita heterogeneidade ao longo do capilar.

#### **3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia do monolito foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. As extremidades do capilar foram cortadas e fixadas em um porta-

amostra tipo fratura por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro, onde o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s para formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As fotomicrografias das partículas foram obtidas com vários aumentos, de acordo com a melhor visualização da morfologia das partículas. Além da caracterização do monolito de sílica dentro dos capilares, foi feita a caracterização de porções do material preparado em frascos nas mesmas condições de síntese das colunas. Como a formação do monolito envolve 5 etapas, a mistura reacional restante foi dividida e colocada em cinco pequenos frascos. Cada frasco recebeu o tratamento térmico e lavagens correspondentes a uma etapa de formação do monolito para posterior caracterização (Tabela 2).

**Tabela 2.** Tratamentos realizados durante a síntese dos monolitos de sílica.

No. Frasco	Tratamento				
	18 h a 40 °C	3 h a 120 °C	Lavagens H <sub>2</sub> O e MeOH	25 h a 330 °C	Lavagens HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O
1	X				
2	X	X			
3	X	X	X		
4	X	X	X	X	
5	X	X	X	X	X

### 3.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Obtiveram-se os espectros de infravermelho na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, usando pastilhas de KBr.

#### 3.4.4. Análise elementar

Os monolitos de sílica e o agente sililante foram submetidos à análise elementar, sendo as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio determinadas no analisador 2100 da Perkim Elmer.

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio consiste em converter os elementos da amostra em gases simples como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> pelo método da combustão. A amostra é primeramente oxidada em uma atmosfera de O<sub>2</sub> puro. Os produtos gerados na zona de combustão incluem CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. Os elementos como os halogênios e o enxofre são removidos por reagentes na zona de combustão. Os gases resultantes são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume e então despressurizados através da coluna, separados e detectados em função de suas condutividades térmicas e convertidos em porcentagem de C, H e N na amostra [128].

#### 3.5. Síntese do agente sililante

Realizou-se a síntese do agente sililante a partir de uma solução equimolar de glicina ou ácido 4-aminobenzóico (PABA), trietoxipropilisocianatossilano (TEPIS) e trietilamina (TEA) em N,N-dimetilformamida (DMF). Manteve-se a reação a 50 °C por 4 h. Após esse tempo, o produto final foi isolado através da remoção do solvente com uma linha de vácuo sob atmosfera de N<sub>2</sub> por 24 h.

Alguns parâmetros da síntese foram avaliados, como tempo de reação (4 h e 8 h) e solvente (DMF e metanol) além do tempo de secagem (24 h e 72 h).

Também foi avaliada a rota de síntese proposta por Zhang *et al.* [129], na qual foram empregadas condições anidras e um excesso do TEPIS. Colocaram-se 5 mmol de PABA em 15 mL de tetrahidrofurano (THF) anidro, 7,5 mmol de TEPIS e deixou-se em refluxo por 8 h, sob atmosfera de N<sub>2(g)</sub>. Após esse tempo, adicionou-se 50 mL de hexano seco para precipitar o produto, o qual foi filtrado e lavado várias vezes com hexano. O sólido branco obtido foi seco sob alto vácuo.

### **3.5.1. Caracterização do agente sililante**

#### **3.5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro modelo MB-100E (Bomem), no intervalo de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , usando pastilhas de KBr.

#### **3.5.1.2. Ressonância magnética nuclear**

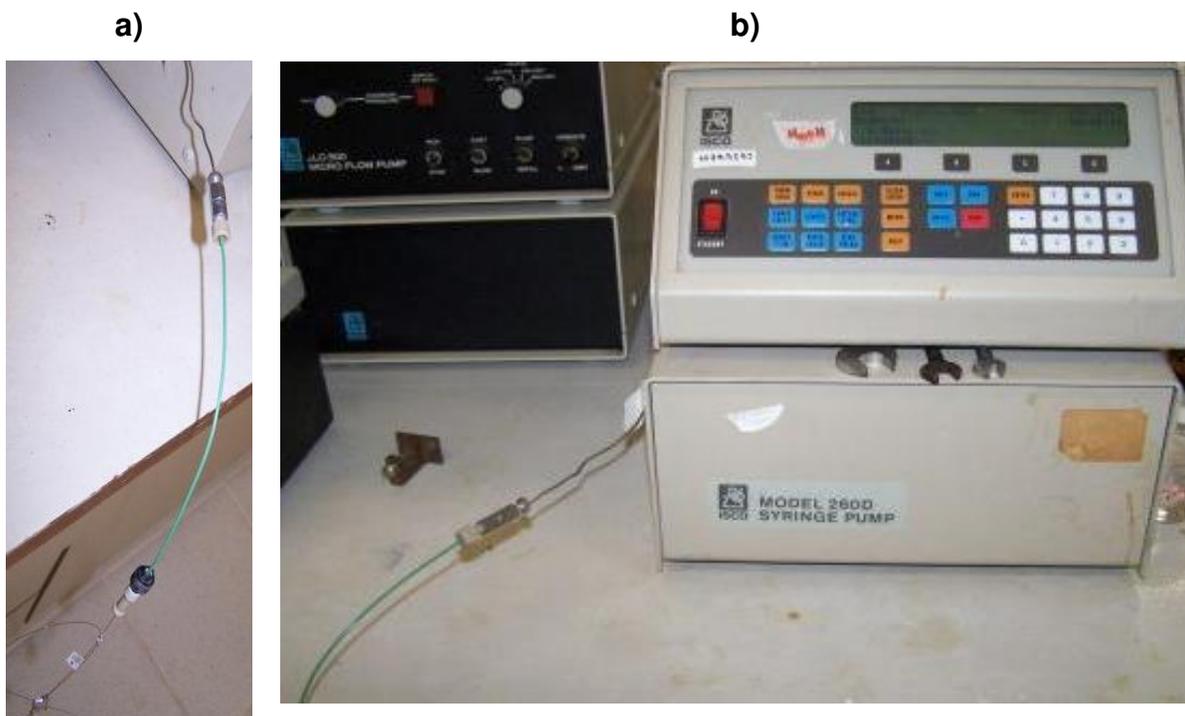
A ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os agentes sililantes foi realizada no espectrômetro INOVA da Varian ou no espectrômetro Bruker. As amostras dos agentes sililantes foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e em dimetilsulfóxido. As frequências utilizadas foram 500 e 125 MHz para os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

#### **3.5.1.3. Espectrometria de massas**

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas AutoSpace híbrido EBE (Micromass). A amostra foi inserida diretamente no espectrômetro com ionização por elétrons, em uma faixa de varredura de massas de 50 a 550. A energia da fonte de ionização era de 70 eV. No equipamento Xevo Q-TOF (Waters), a amostra foi introduzida no espectrofotômetro por infusão direta com ionização *electrospray* negativa, numa faixa de varredura de massas de 25 a 350, com o capilar em 3,0 kV, o cone em 30 V e a temperatura da fonte em 100 °C.

### **3.6. Derivatização do monolito de sílica**

Para introduzir a solução do agente sililante na coluna monolítica de sílica foi usado um tubo de *peek* (do inglês, *poly ether ether ketone*, L= 22 cm, 100  $\mu\text{m}$  d.i.) com adaptadores adequados para permitir a conexão em série das colunas com uma bomba de CLAE, como ilustra a Figura 12.



**Figura 12.** Fotos do sistema empregado para funcionalizar os monolitos de sílica no modo *on line*, a) tubo *peek* e conectores, b) bomba seringa.

Para derivatizar o monolito de sílica, utilizou-se como referência as condições descritas por Tanaka *et al.* [127], usando uma solução 10% m/m do agente sililante em DMF ou metanol (dependendo do solvente usado para a síntese do agente sililante), deixando reagir a 60 °C de 3 a 48 h, colocando nova solução do agente sililante em intervalos de 1, 2 e 12 h, conforme o tempo de reação. Percolou-se 250  $\mu$ L da solução através da coluna. Posteriormente, a coluna foi lavada com metanol por 1 h para eliminar o excesso do agente sililante e, a seguir, com metanol/água 50:50 v/v por 4 h. Com esta lavagem, os grupos etóxi do agente sililante que não reagiram foram hidrolisados. Para obter o mesmo material em frasco, foi utilizada a sílica obtida no frasco 5 (Tabela 2), a qual foi submetida à funcionalização e a lavagens iguais às feitas na coluna monolítica.

O agente sililante obtido pela rota de síntese proposta por Zhang *et al.* [129], foi usado para funcionalizar os monolitos de sílica a 60 °C com uma solução 20% m/m do agente sililante em metanol por 6 h, trocando a solução do silano a cada 2 h.

### **3.6.1. Caracterização do monolito de sílica derivatizado**

Os materiais resultantes foram caracterizados por análise elementar e espectroscopia no infravermelho usando os mesmos equipamentos e procedimentos descritos nas seções 3.5.1.1. e 3.5.1.2..

### **3.7. Condicionamento dos monolitos**

O condicionamento da FE com a FM deve ser realizado antes da FE ser usada pela primeira vez. Este condicionamento é feito com a percolação de um fluxo de FM pressurizado e posterior aplicação de uma rampa de potencial até que a linha de base se estabilize, conforme recomendado por Fonseca [130]. Para as colunas monolíticas de sílica obtidas neste trabalho, foram necessárias algumas horas de condicionamento antes de efetuar a primeira corrida, sendo em média 2 h na bomba de CLAE e patamares de 60 min para cada potencial, iniciando em 5 kV e terminando em 25 ou 30 kV (dependendo do equipamento de EC utilizado) com incrementos de 5 kV.

Uma vez condicionada a coluna com o eletrólito de corrida, o protocolo de condicionamento no início do dia foi de 5 min em cada potencial iniciando em 5 kV e terminando no potencial aplicado durante a corrida, com incrementos de 5 kV. O condicionamento entre corridas foi feito aplicando o potencial de corrida por 5 min. Quando necessário, foi feita a mudança da composição do eletrólito de corrida. Primeiramente foi feita uma lavagem da coluna, aplicando pressão de até 6 bar e, posteriormente, um condicionamento usando rampa de potencial com patamares de 5 min até alcançar estabilidade na linha de base.

Paralelamente aos testes realizados com as colunas monolíticas, nas determinações com detecção  $C^4D$ , foram feitos testes com um capilar vazio de dimensões semelhantes. O condicionamento do capilar de sílica vazio foi feito conforme o seguinte protocolo no início do dia: 10 min de  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  com pressão; 15 min de  $H_2O$  deionizada com pressão, 15 min de eletrólito de corrida com pressão, 5 min de eletrólito de corrida com o potencial de corrida. Após 3 injeções, o eletrólito de corrida era renovado dentro do capilar e nos reservatórios.

Todas as soluções usadas na avaliação eletroforética foram filtradas e colocadas em banho de ultrassom por 20 min, para degaseificação.

Para as avaliações eletroforéticas, fez-se a injeção electrocinética com 5 kV por 10 s.

### 3.8. Avaliação eletroforética dos monolitos

#### 3.8.1 Detecção C<sup>4</sup>D

Os analitos e as condições de trabalho dos detectores C<sup>4</sup>D de cada sistema estão sumarizados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Analitos analisados e condições de trabalho dos detectores C<sup>4</sup>D.

Sistema	Analitos / 1 mmol L <sup>-1</sup>	Frequência / kHz	Amplitude V <sub>p</sub> / V
1	K <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	583	1,4
1	Arginina (Arg), Histidina (His), Lisina (Lis)	583	1,4
1	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	453	3,1
2	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	555	2,0
2	Arg, His e Lis	555	2,0
3	K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup>	453	3,4

V<sub>p</sub> é a Voltagem de pico.

Foram preparados 25 mL de solução padrão estoque 0,1 mol L<sup>-1</sup> em água de cada um dos analitos da Tabela 3, a cada três meses. Posteriormente, foram feitas as diluições e as misturas, adequadas para cada experimento de avaliação das FE.

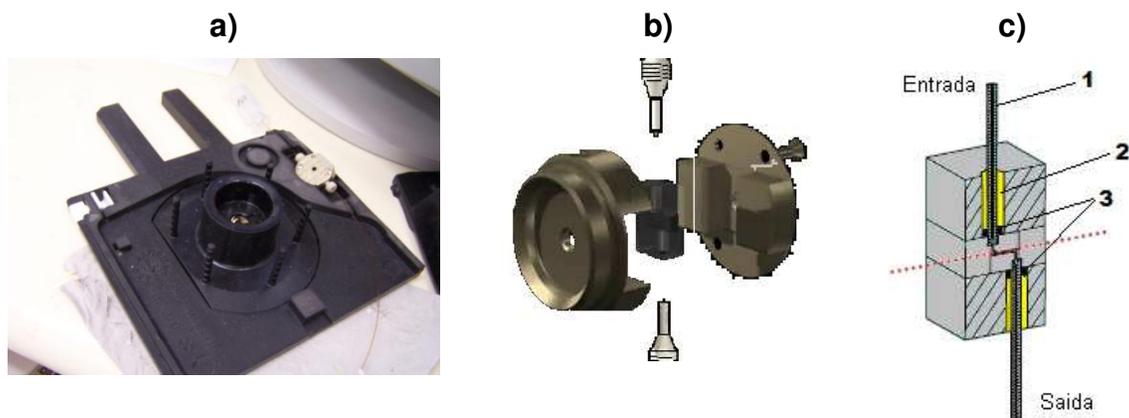
#### 3.8.2 Detecção UV

Foram preparados 10 mL de solução padrão estoque 0,1 g L<sup>-1</sup> dos analitos em ACN, repetindo a cada três meses. As diluições eram feitas no dia das avaliações de cada FE.

As amostras consistiram em misturas de parabenos (metil, etil, propil e butilparabeno), de fármacos (paracetamol, fenacetina, propranolol, atenolol, amitriptilina, nortriptilina e clorfeniramina), todos na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  e de benzenos (etil, propil, butil e pentilbenzeno), na concentração de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , utilizando-se tiourea  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  como marcador de FEO.

### 3.8.2.1 Cella de alta sensibilidade

Para realizar a detecção UV em ECC avaliou-se a possibilidade de usar a cela de alta sensibilidade, pois esta viabiliza o uso de colunas sem janela de detecção no equipamento Agilent. A cela foi projetada pelo fabricante para uso em ECZ, ou seja, utilizando um capilar vazio, mas foi feita uma adaptação para usar as colunas monolíticas conectadas a esta cela. Esta conexão foi possível colocando um pequeno pedaço de adaptador tipo luva, o que evitou a saída dos capilares da mesma. A Figura 13c ilustra o sistema adaptado.



**Figura 13.** a) Coluna monolítica capilar montada na cela de alta sensibilidade b) cela de alta sensibilidade aberta e c) esquema interno da cela de alta sensibilidade: 1) coluna capilar, 2) adaptador Agilent e 3) adaptador tipo luva de  $0,0155 \times 0,025 \text{ cm}$  para capilar, *Micro Tight sleeve Green*, Upchurch.



# **CAPÍTULO 4**

## **RESULTADOS E**

### **DISCUSSÃO**



## **4.1. Preparação da coluna monolítica de sílica**

Foram testadas duas rotas de síntese das colunas monolíticas, sendo que a primeira empregou TEOS e, a segunda, TMOS na mistura reacional.

Com o TEOS não se obteve sucesso na formação do monolito no interior do capilar. Um dos motivos que impossibilitaram a formação do monolito no capilar foi a heterogeneidade da mistura reacional, ou seja, a mistura estava composta por duas fases líquidas, o que impediu o preenchimento do capilar de maneira eficiente. Segundo a literatura [131,132], o reagente TEOS é mais usado para gerar um entrecruzamento de partículas de sílica prontas ou então em conjunto com TMOS ou outros silanos para formar a estrutura monolítica. Por outro lado, em paralelo, foi possível acompanhar a formação da sílica dentro de um frasco e verificou-se o completamento da síntese.

A partir dos materiais obtidos com TEOS no frasco, observou-se que um deles tinha uma coloração marrom após o tratamento térmico a 330 °C e o outro não. Uma explicação para este fato é que as lavagens com metanol e água, após aquecimento por 3 h a 120 °C, não foram suficientes para eliminar o excesso dos reagentes ureia e PEG, os quais permaneceram na mistura e queimaram durante o tratamento a 330 °C. A partir destes resultados, as lavagens dos monolitos, sílica de referência, foram feitas exaustivamente com, pelo menos, 250 mL de cada solvente.

Na rota que emprega o TMOS como reagente precursor, foi gerada uma mistura homogênea, o que permitiu o preenchimento do capilar e deu origem a estruturas monolíticas homogêneas. Por tal motivo, foi usado este reagente para preparação de todos os monolitos apresentados no presente trabalho.

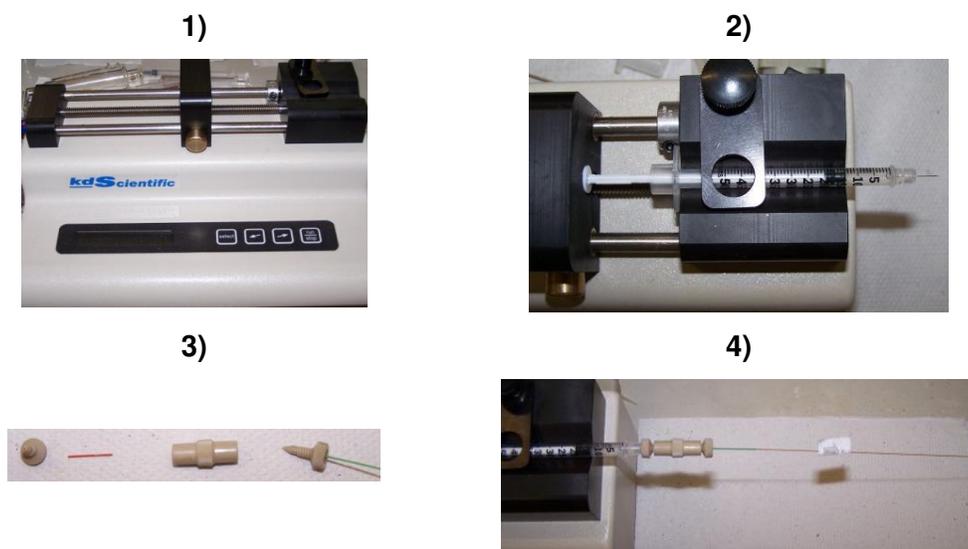
### **4.1.1. Preenchimento do capilar**

O preenchimento do capilar com a mistura reacional é um dos momentos mais críticos na preparação da coluna monolítica, pois nesta etapa determina-se a homogeneidade do monolito. Para isso, procurou-se ao longo deste trabalho o

aprimoramento dos dispositivos empregados na introdução da mistura reacional dentro do capilar sem bolhas, sem variações de temperatura e sem vazamentos. Com esse objetivo, foram testados os seguintes dispositivos:

- a) Seringas de vidro e conectores,
- b) Seringas de polietileno adaptadas,
- c) Seringas de vidro realizando o processo de sucção ao invés da injeção,
- d) Sugador de solda adaptado, também para sucção.
- e) Seringa para insulina de 0,5 mL, uma bomba seringa com uma vazão de 2 mL h<sup>-1</sup> e adaptadores para capilar.

O dispositivo que apresentou melhor desempenho para o preenchimento da mistura reacional dentro dos capilares foi este último. A Figura 14 ilustra os dispositivos usados nesta última opção e também o sistema completo.



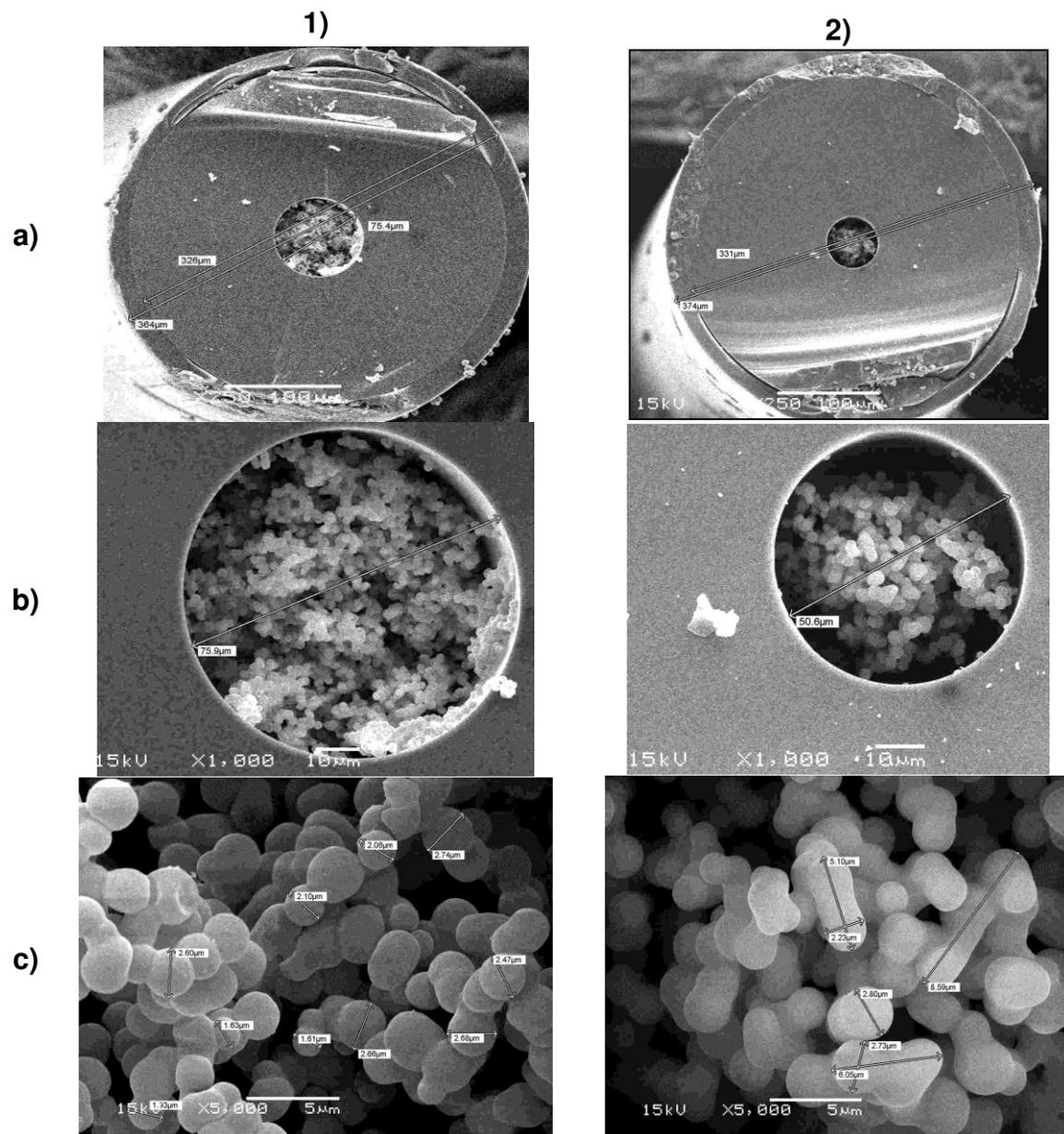
**Figura 14.** Fotos do sistema para preenchimento de capilares, 1) bomba seringa, 2) seringa para insulina com agulha integrada, 3) conectores e luvas para capilar 4) sistema montado.

### 4.1.2. Caracterização dos monolitos de sílica

#### 4.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

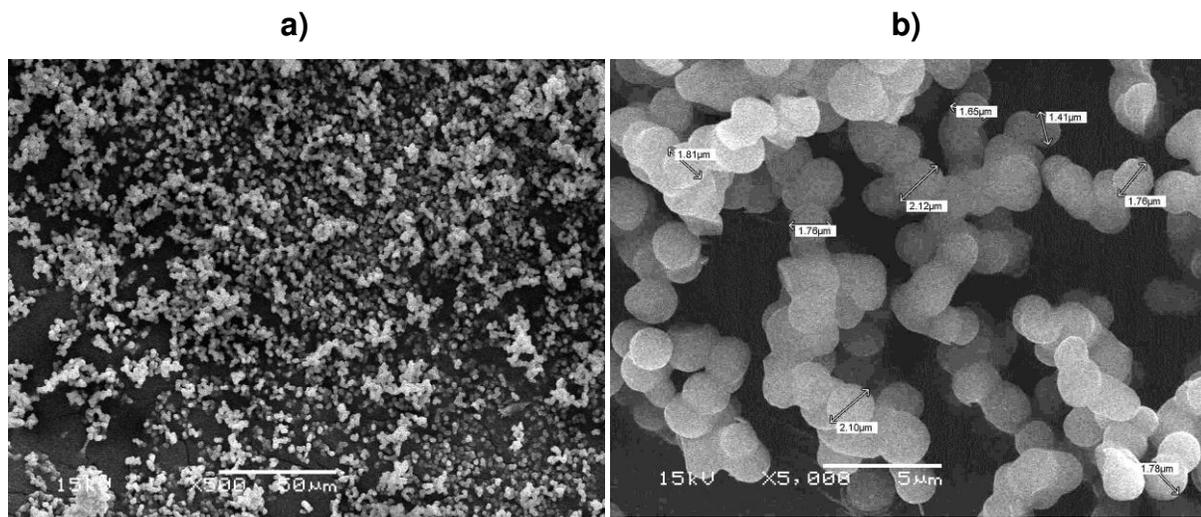
Prepararam-se várias colunas monolíticas de sílica de 50, 75 e 100  $\mu\text{m}$  d.i.. Realizou-se análise por microscopia eletrônica da maioria delas para verificar o

ancoramento do monolito ao capilar, assim como a morfologia dos macroporos. Com o auxílio das micrografias, foi possível observar que a estrutura monolítica era constituída de partículas arredondadas com tamanho médio de  $2,5 \mu\text{m}$ . As micrografias típicas das colunas podem ser vistas na Figura 15. É importante destacar os canais entre as partículas, os quais são responsáveis pela permeabilidade da FM ao longo das colunas. A estrutura destes canais oferecem menor resistência ao fluxo da FM comparada às FE particuladas.



**Figura 15.** Microscopia eletrônica das colunas monolíticas: **1)**  $75 \mu\text{m}$  e **2)**  $50 \mu\text{m}$  com aumentos de **a)** 250, **b)** 1000 e **c)** 5000 vezes.

Também utilizou-se análise por MEV do material preparado nos frascos, obtido com o restante da mistura reacional, o qual foi preparado pelo mesmo procedimento que as colunas monolíticas. A Figura 16 apresenta uma das microscopias da sílica obtida.



**Figura 16.** Microscopia eletrônica da sílica nua com aumentos de: **a)** 500 e **b)** 5000 vezes.

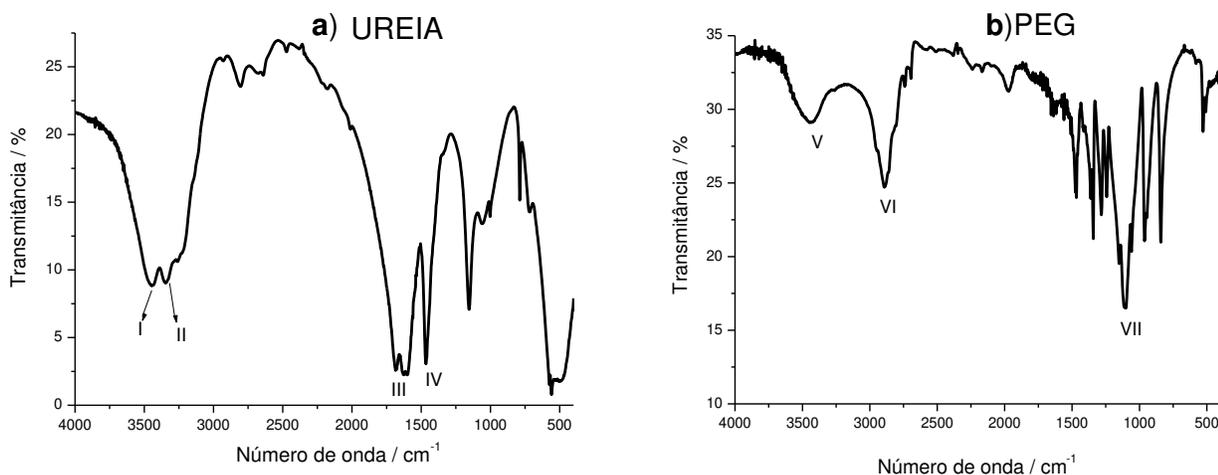
Comparando a Figura 16 b) com as Figuras 15 c), pode-se observar que o material obtido é semelhante àquele sintetizado dentro do capilar, não havendo diferenças significativas. O material da Figura 16 b) foi denominado de monolito sem funcionalização ou de sílica nua, nos próximos itens.

#### 4.1.2.2. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de inestimável importância na síntese química, pois ajuda a identificar e elucidar os grupos funcionais presentes nas estruturas dos compostos sintetizados, bem como acompanhar o desaparecimento das bandas dos grupos funcionais dos reagentes. Este recurso ajudou a observar a evolução da formação da sílica nua em cada etapa do processo de síntese do monolito.

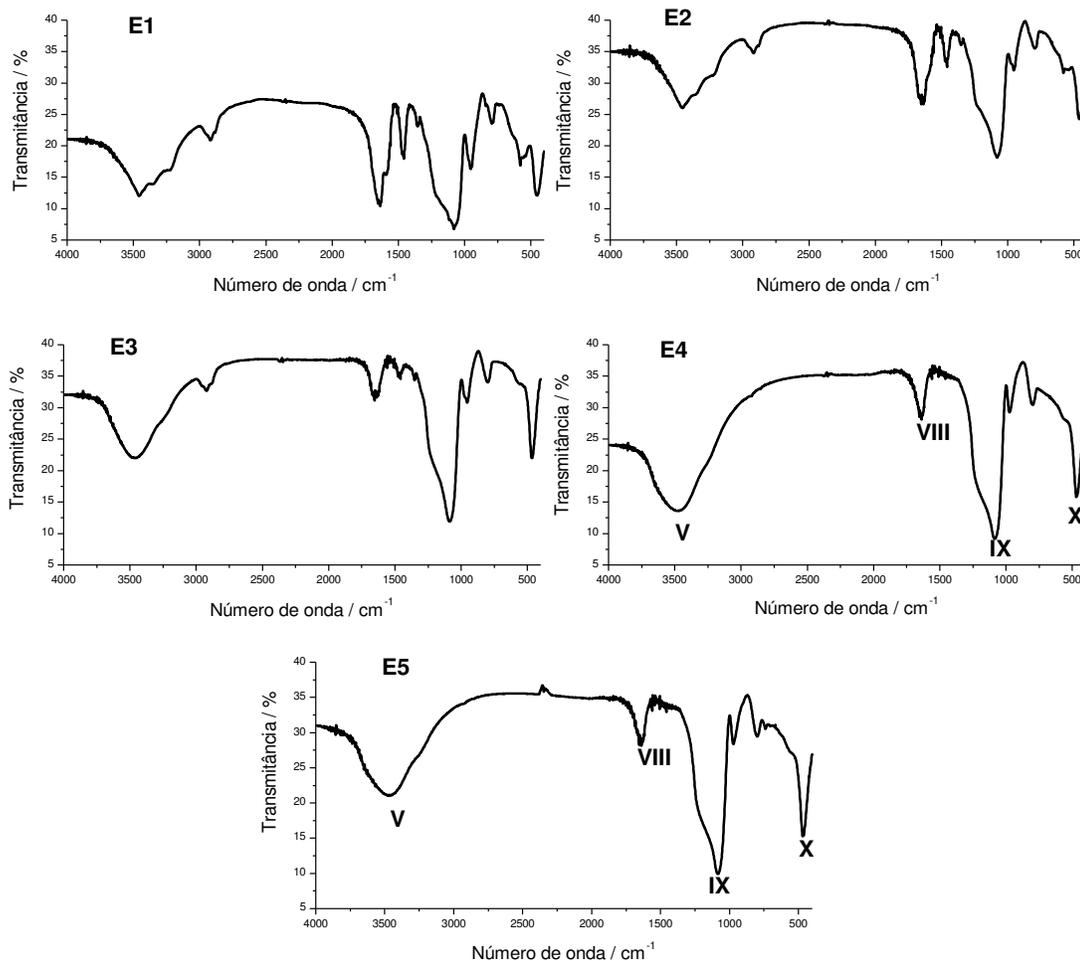
A Figura 17 apresenta os espectros no IV das matérias-primas ureia e PEG, ressaltando as bandas características de cada composto. Assim, a ureia

apresenta bandas em  $3450$  e  $3340\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{NH}_2$  (**I** e **II**), uma banda em  $1683\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{C}=\text{O}$  (**III**) e uma banda em  $1470\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{C}-\text{N}$  (**IV**). Já o PEG possui banda em  $3439\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{O}-\text{H}$  (**V**), banda em  $2894\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{C}-\text{H}$  (**VI**) e outra banda em  $1096\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos  $\text{C}-\text{O}$  (**VII**).



**Figura 17.** Espectros no Infravermelho para: **a)** ureia estiramentos (**I** e **II**,  $\text{NH}_2$ ), (**III**,  $\text{C}=\text{O}$ ) e (**IV**,  $\text{C}-\text{N}$ ) e **b)** polietilenoglicol (PEG) (**V**,  $\text{O}-\text{H}$ ), (**VI**,  $\text{C}-\text{H}$ ) e (**VII**,  $\text{C}-\text{O}$ )

Na Figura 18 são apresentados os espectros do material em cada etapa de preparo do monolito. É possível observar a presença das bandas características do PEG e da ureia até antes da calcinação. Após essa etapa, restaram apenas as bandas características da sílica. Nas Figuras 18E4 e 18E5, a banda de absorção em  $\sim 3470\text{ cm}^{-1}$  (**V**) corresponde aos estiramentos das ligações  $\text{O}-\text{H}$ , que são atribuídos a grupos silanóis não condensados e água residual. A presença de água, fisicamente adsorvida, é comprovada pela banda em  $1638\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a deformação  $\text{O}-\text{H}$  da molécula de água (**VIII**). A banda intensa em  $1071\text{ cm}^{-1}$  é característica e atribuída aos estiramentos assimétricos do grupo  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$  (**IX**) e a banda em  $472\text{ cm}^{-1}$  (**X**) corresponde a ligações  $\text{Si}-\text{O}$ .



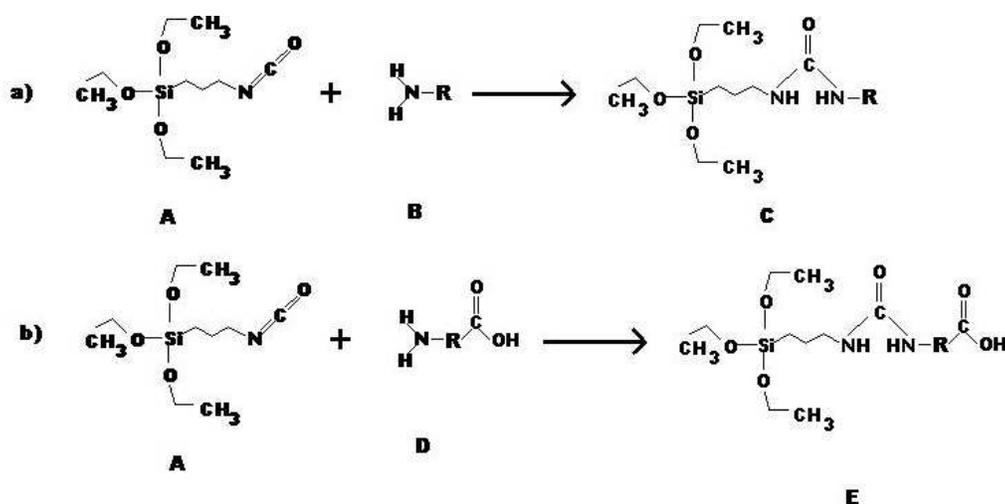
**Figura 18.** Espectros no Infravermelho para a sílica após cada etapa de preparação do monolito: E1) Após 40 °C por 18 h; E2) Após 3 h a 120 °C, sem lavar; E3) Após lavagem; E4) Após 25 h a 330 °C; E5). Material calcinado e lavado com água, HNO<sub>3</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> e água até pH 7. Estiramentos das ligações (V) O-H, (VIII) H<sub>2</sub>O, (IX) Si-O-Si e (X) Si-O.

## 4.2. Preparação do agente sililante

Silva *et al.* [101] sintetizaram alguns alcoxissilanos com grupo ureia embutido em cadeias alifáticas para serem usados na modificação de sílicas cromatográficas utilizando, como rota de síntese, o esquema ilustrado na Figura 19 a). Nesta Figura, o composto A é o TEPIS e o composto B é uma amina

primária alifática, onde R varia entre 4 a 18 carbonos. O composto C é o agente sililante resultante com grupo ureia embutido na cadeia alifática.

No presente trabalho, foi feita a síntese de um agente sililante (chamado também de silano) com um grupo ureia embutido em uma cadeia polar, conforme a rota da Figura 19 b). Para obter um silano com características adequadas para ser usado em ECC, foram avaliados compostos contendo um grupo amino e um grupo ácido na mesma estrutura (composto D). Além dos grupos funcionais, o composto D deve ser solúvel em um solvente aprótico, para evitar a hidrólise dos grupos etóxi do TEPIS durante a síntese.



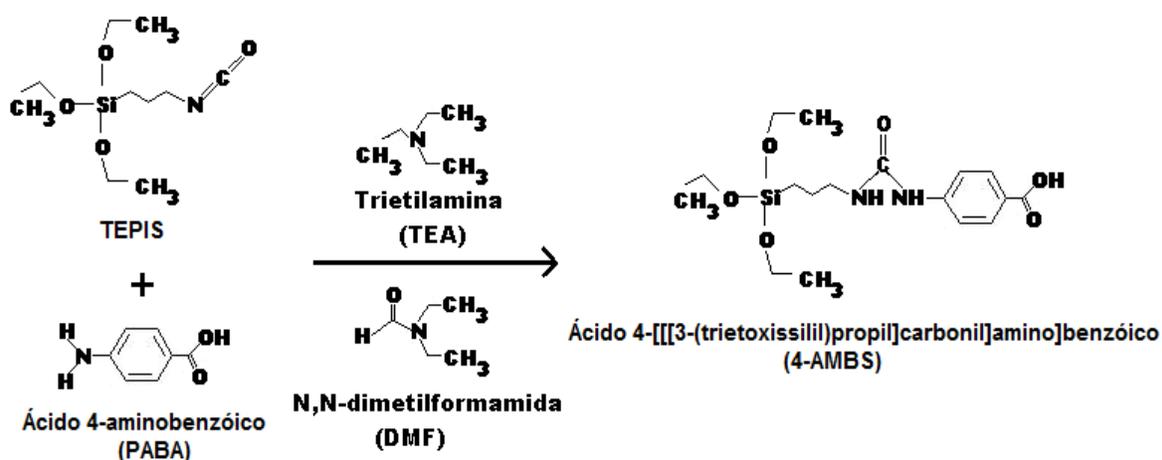
**Figura 19.** Esquema das reações de obtenção dos agentes sililantes com grupo ureia embutido a) na cadeia alifática b) na cadeia contendo o grupo polar com o grupo ácido carboxílico terminal.

Assim, antes de sintetizar o agente sililante, realizaram-se testes de solubilidade dos candidatos disponíveis: glicina e ácido para-aminobenzóico (PABA). Os resultados obtidos com glicina são mostrados na Tabela 4, sendo que nenhum dos solventes avaliados solubilizou a glicina adequadamente. Mesmo assim, realizou-se um teste com uma mistura reacional heterogênea (teste 7), a qual foi mantida a 50 °C por 4 h, mas também não se observaram mudanças. Por tal motivo, abandonou-se a síntese do agente sililante tendo a glicina como precursor.

**Tabela 4.** Teste de solubilidade da glicina em vários solventes e misturas.

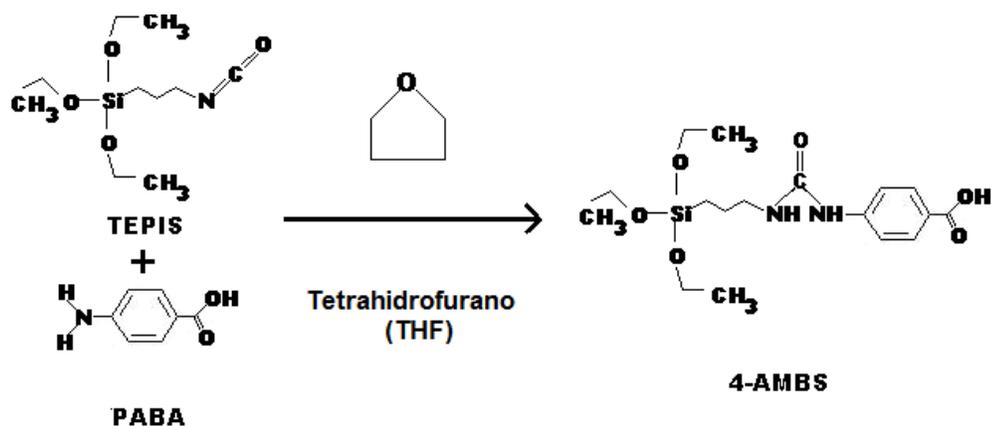
No. de Teste	Glicina / g	Solventes	Quantidade adicionada/ mL	Solubilidade
1	0,0500	Piridina	5	Insolúvel
2	0,0500	Trietilamina	5	Insolúvel
3	0,0500	Tetrahidrofurano	3	Insolúvel
4	0,0500	Acetona	5	Insolúvel
5	0,0500	DMF	5	Insolúvel
6	0,0500	Dimetilsulfóxido (DMSO)	5	Insolúvel
7	0,3000	DMF e trietilamina	5 e 0,6	Insolúvel
8	0,3000	DMSO e trietilamina	5 e 0,6	Insolúvel

Testes semelhantes foram efetuados com PABA, obtendo-se resultados positivos na solubilização em DMF. Assim, a síntese do agente sililante foi feita a partir do PABA e, posteriormente, o produto foi caracterizado. Para evitar reações indesejadas com o grupo ácido do PABA foi adicionada uma quantidade equimolar de trietilamina à solução de PABA em DMF e, por último, acrescentou-se o TEPIS. A Figura 20 mostra a reação ocorrida nesta síntese.

**Figura 20.** Reação de obtenção do agente sililante 4-AMBS.

O agente sililante obtido por esta rota de síntese foi difícil de purificar, já que sempre apresentou resíduos de matéria-prima e/ou solvente. A pureza do silano era importante para sua caracterização inequívoca e também para realizar a funcionalização da fase monolítica. Caso resíduos de TEPIS e PABA estivessem presentes no agente sililante, estes poderiam se ligar ao monolito de sílica.

Por tal motivo, foi feita a síntese do silano pela rota proposta por Zhang *et al.* [129] (Figura 21), a partir da qual foi obtido um sólido branco livre de TEPIS e PABA, utilizando como solvente o THF. Nos próximos itens, são apresentados os resultados para cada um dos silanos sintetizados e que foram identificados como 4-AMBS\_DMf e 4-AMBS\_THF.

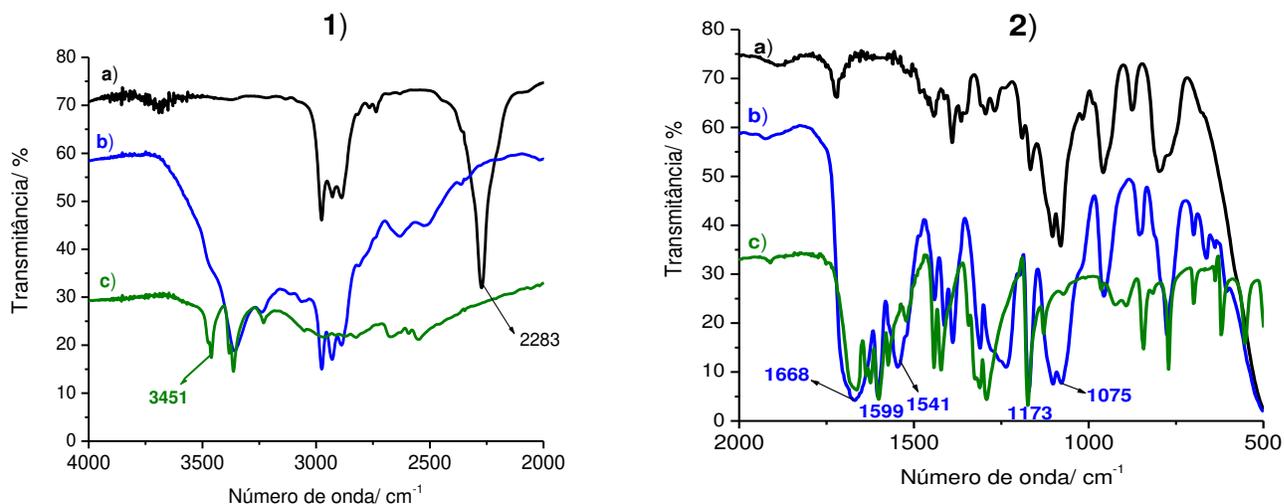


**Figura 21.** Reação de obtenção do agente sililante 4-AMBS segundo Zhang *et al.* [129].

#### 4.2.1. Caracterização do agente sililante

##### 4.2.1.1. Espectroscopia no Infravermelho

Para facilitar a visualização das mudanças ocorridas nos espectros de cada um dos reagentes e no espectro do 4-AMBS, todos os espectros de IV foram colocados no mesmo gráfico e subdivididos em duas regiões: 1) de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  e 2) de 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , conforme mostram as Figuras 22 e 23.

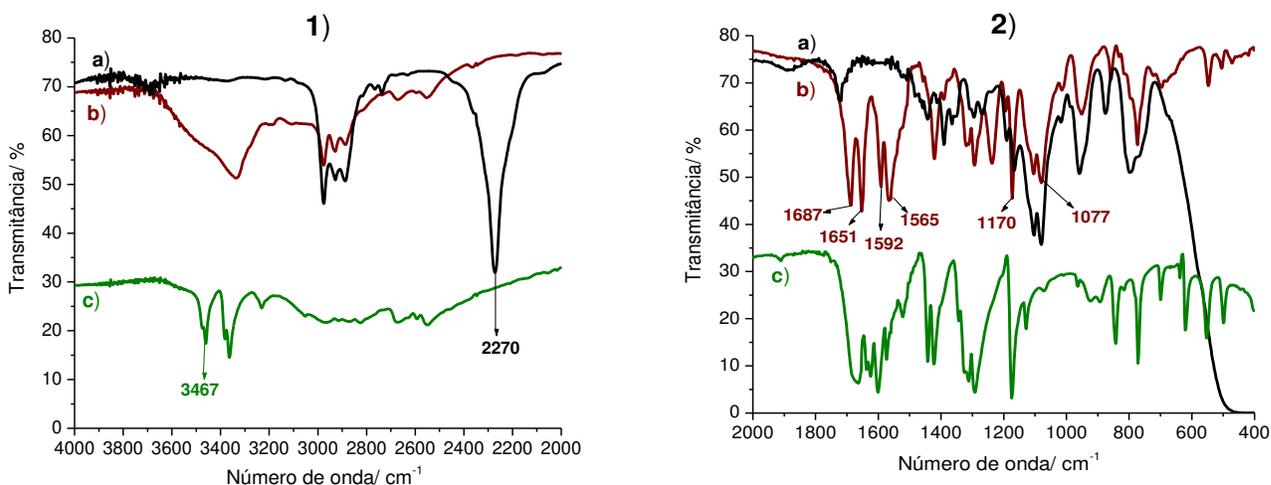


**Figura 22.** Espectro no infravermelho para: a) TEPIS, b) 4-AMBS\_DMF e c) PABA.

Na primeira região da Figura 22\_1, é possível notar que o espectro do 4-AMBS\_DMF não apresenta as bandas em  $3451\text{ cm}^{-1}$ , características do estiramento da ligação N-H<sub>2</sub> do PABA, e a banda em  $2283\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à ligação  $\text{-N=C=O}$  do TEPIS. Estas duas mudanças confirmam que foi formado o produto esperado, pois justamente a ligação formada no 4-AMBS envolve esses dois grupos funcionais (Figura 20).

Na segunda região (Figura 22\_2) esperava-se identificar o grupo  $\text{-C=O}$  da ureia formada. Porém, as bandas características do grupo ácido e do anel aromático são mais intensas e não foi possível visualizar esta banda.

Para o 4-AMBS\_THF, ilustrado na Figura 23, o raciocínio para a primeira região é o mesmo e as bandas em  $3451\text{ cm}^{-1}$  e  $2283\text{ cm}^{-1}$  não estão presentes no produto formado. Já na segunda região, o espectro apresenta melhor definição, as bandas ficaram separadas e puderam ser identificadas. Assim, a banda em  $1687\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=O do ácido carboxílico; a banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$  ao  $\text{-C=O}$  do grupo ureia; as bandas em  $1565\text{ cm}^{-1}$  e  $1592\text{ cm}^{-1}$  ao  $\text{-NH}$  do grupo ureia, a banda em  $1170\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento da ligação Si-C e a banda em  $1077\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento da ligação Si-O-Si [129].



**Figura 23.** Espectro no infravermelho para 1 e 2: a) TEPIS, b) 4-AMBS\_THF e c) PABA.

#### 4.2.1.2. Análise elementar

Os resultados da análise elementar para o 4-AMBS\_DMF indicam a formação do agente sililante, porém acusam a presença de resíduo de DMF, uma vez que as percentagens de C, H e N aproximam-se daquelas obtidas com o 4-AMBS com 3 moléculas de DMF, como é mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Comparação dos resultados esperados para o 4-AMBS ( $C_{17}H_{28}N_2O_6Si$ ) e os obtidos pela análise elementar.

	Teórico $C_{17}H_{28}N_2O_6Si$	Teórico $C_{17}H_{28}N_2O_6Si \cdot 3 DMF$	Experimental
%C	53,1	51,7	49,1
%H	7,3	8,2	7,4
%N	7,3	11,6	11,4

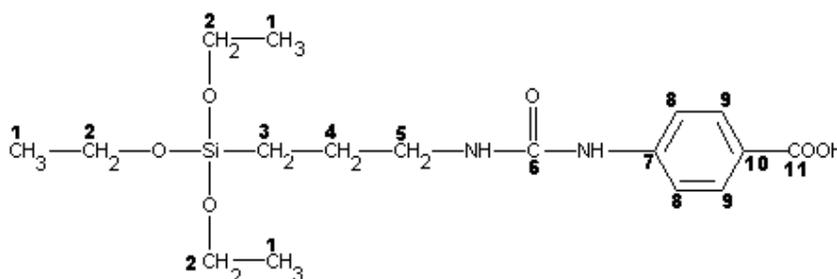
Já para o 4-AMBS\_THF, os resultados da análise elementar são semelhantes aos resultados teóricos, conforme é possível observar na Tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação dos resultados esperados e os obtidos na análise elementar do 4-AMBS\_THF.

	<b>C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si (Teórico)</b>	<b>Experimental</b>
<b>%C</b>	53,1	51,4
<b>%H</b>	7,3	7,1
<b>%N</b>	7,3	7,2

#### 4.2.1.3. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H

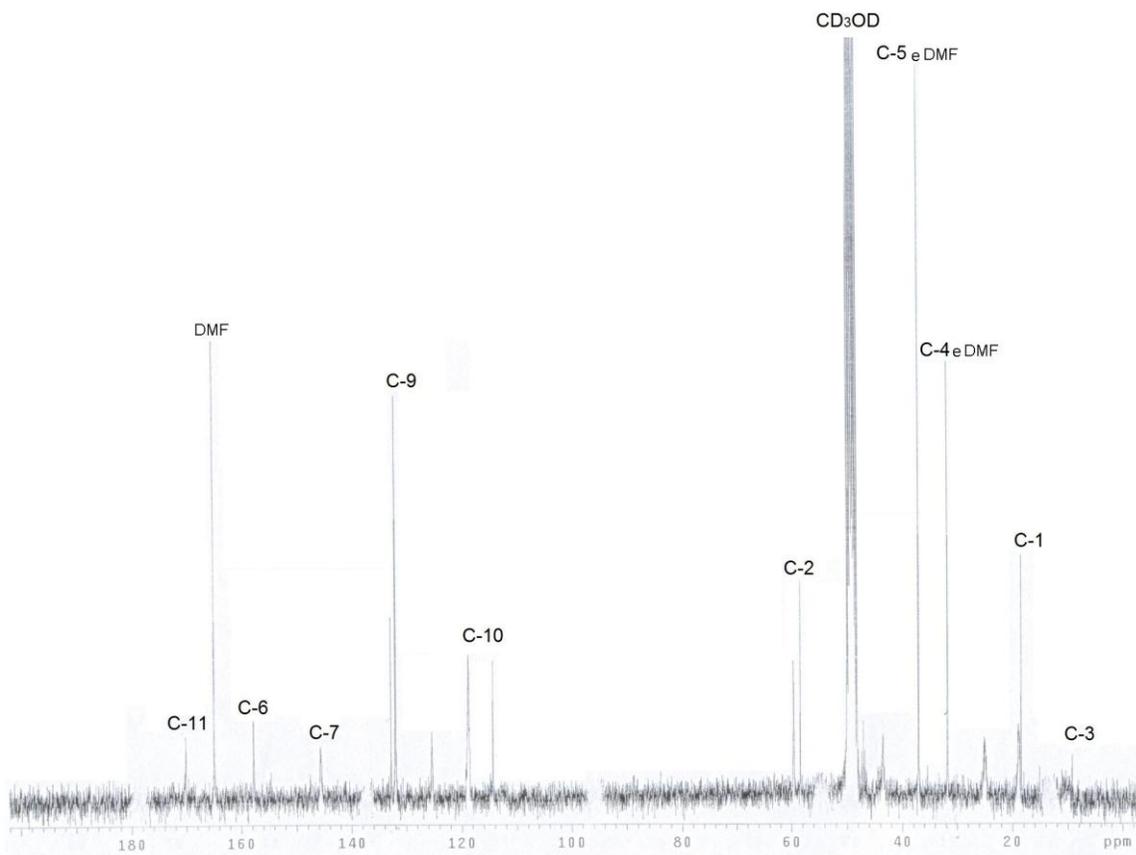
Foram adquiridos os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para os dois agentes sililantes. Para o 4-AMBS\_DMF, os espectros foram difíceis de interpretar devido à presença de solventes remanescentes (Figura 24). Mas, comparando os resultados obtidos por Silva *et al.* [101], foi possível a identificação dos sinais correspondentes aos carbonos do agente sililante. No esquema a seguir, é apresentada a estrutura esperada do composto 4-AMBS com a numeração usada para a identificação dos carbonos.



O espectro de RMN de <sup>13</sup>C em (CD<sub>3</sub>OD) para o 4-AMBS\_DMF apresentou os seguintes sinais:  $\delta = 9,2$  (C3), 18,4 (C1), 31,7 (C4 e DMF), 36,9 (C5 e DMF), 49,0 (CD<sub>3</sub>OD), 58,3 (C2), 118,7 (C8), 125,3 (C10), 131,9 (C9), 145,6 (C7) 157,7 (C6), 163,0 (DMF), 170,1 (C11), conforme mostra a Figura 24.

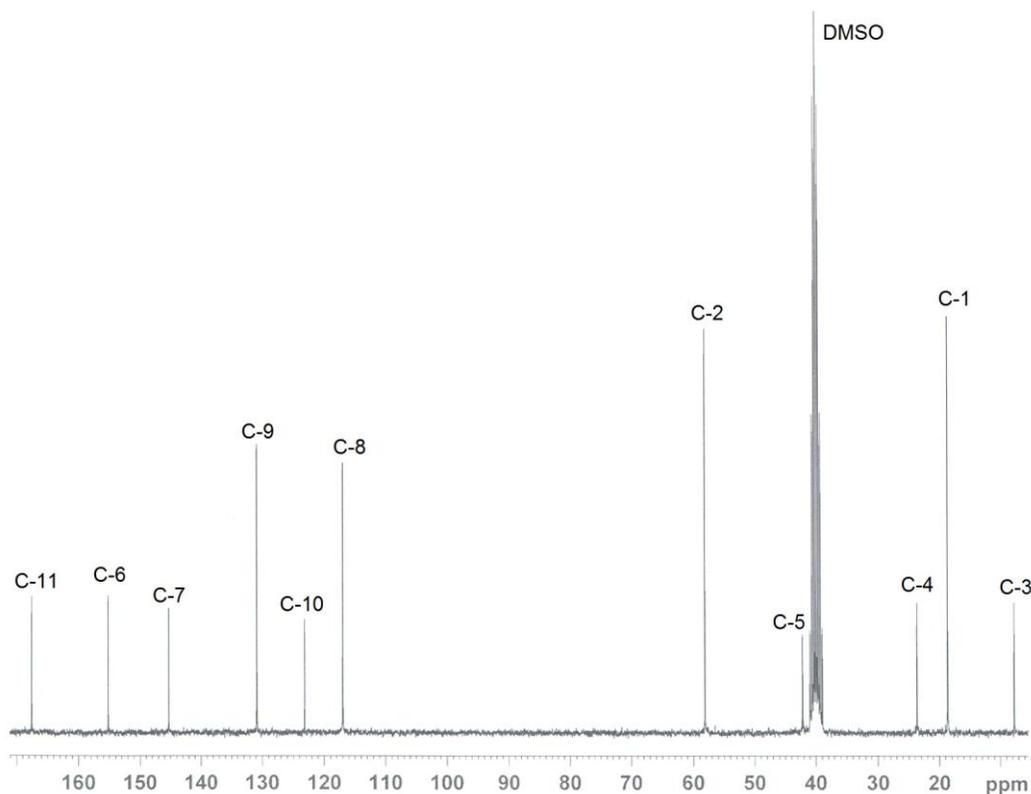
Um dos compostos que poderiam estar presentes nesta amostra é o PABA e os deslocamentos químicos para este são 118,1 ppm (presente), 168,8 ppm (o sinal pode estar encoberto com o sinal de DMF), 131,6 ppm (coincide com C-9).

Os deslocamentos em 113,3 ppm e 152,4 ppm não estão presentes, o que indica que o PABA não permaneceu no produto de reação. Outro composto que poderia estar presente seria o TEPIS, que apresenta os mesmos deslocamentos químicos que o 4-AMBS. Entretanto, pelo espectro de IV apresentado no item anterior, o TEPIS não está presente no produto de reação 4-AMBS\_DMF. Outro composto que poderia estar presente nesta amostra seria a TEA, que apresenta dois deslocamentos, um em 11,6 ppm (não visível) e outro em 47,7 ppm (que pode estar oculto no deslocamento químico de CD<sub>3</sub>OD).



**Figura 24.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C em (CD<sub>3</sub>OD) para o 4-AMBS\_DMF.

Por outro lado, o espectro do 4-AMBS\_THF é mais limpo e de fácil interpretação, como mostra a Figura 25. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C em (DMSO, d<sub>6</sub>) para o 4-AMBS\_THF apresentou os seguintes sinais:  $\delta = 7,7$  (C3), 18,6 (C1), 23,7 (C4), 40,0 (DMSO), 42,2 (C5), 58,1 (C2), 117,0 (C8), 123,2 (C10), 131,9 (C9), 145,3 (C7) 155,2 (C6), 167,5,1 (C11).

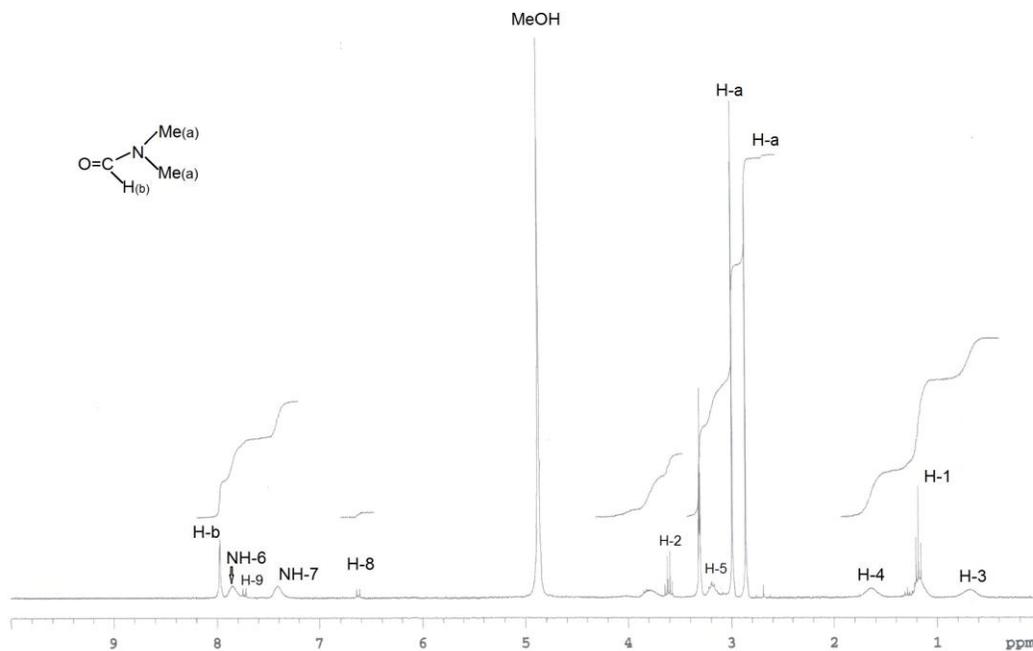


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em (DMSO,  $d_6$ ) para o 4-AMBS\_THF.

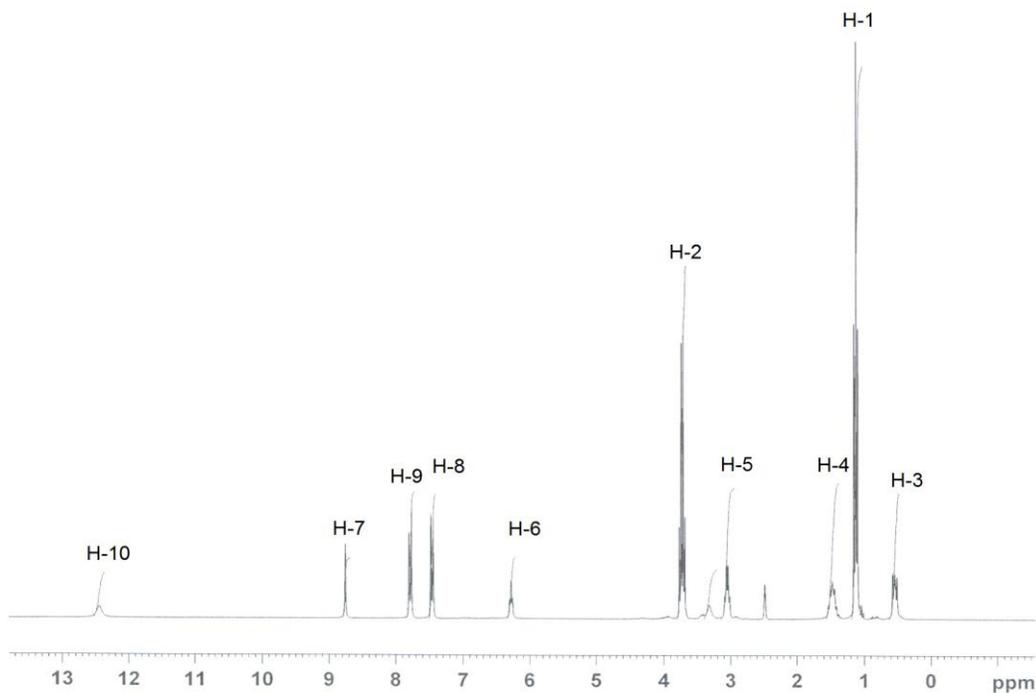
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os agentes sililantes estão ilustrados nas Figuras 26 e 27.

A interpretação do espectro para 4-AMBS\_DMF foi realizada em função da integração. No espectro foi possível observar a maioria dos deslocamentos químicos designados às frações da estrutura, sendo que somente o deslocamento químico de COOH não pôde ser identificado. Isto ocorre, pois quando se usa um solvente prótico deuterado, pode haver substituição do hidrogênio do grupo ácido por um deutério, tornando-o imperceptível no espectro. Além disso, foram encontrados os deslocamentos químicos do DMF.

Para avaliar se restaram impurezas nesta amostra a partir do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , os deslocamentos para PABA e TEPIS seriam iguais aos apresentados por 4-AMBS. Para a TEA, os deslocamentos em 0,98 e 2,42 ppm não estão presentes, indicando novamente que o 4-AMBS\_DMF está livre de TEA.



**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para o 4-AMBS\_DMF H-1,  $\text{CH}_3(\text{OEt})$ ; H-2,  $\text{OCH}_2$ ; H-3,  $\text{SiCH}_2$ ; H-4,  $\text{CH}_2$ ; H-5,  $\text{NCH}_2$ ; H-8, ArH; H-7, NH; H-6, NH; H-9, ArH e H-10, COOH.



**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em ( $\text{DMSO}, \text{d}_6$ ) para o 4-AMBS\_THF H-1,  $\text{CH}_3(\text{OEt})$ ; H-2,  $\text{OCH}_2$ ; H-3,  $\text{SiCH}_2$ ; H-4,  $\text{CH}_2$ ; H-5,  $\text{NCH}_2$ ; H-8, ArH; H-7, NH; H-6, NH; H-9, ArH e H-10, COOH.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em DMSO ( $d_6$ ) do 4-AMBS\_THF foi comparado com o obtido por Zhang *et al.* [129]. Na Tabela 7 são mostrados os deslocamentos químicos para cada um deles.

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos do 4-AMBS no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

4-AMBS	CH <sub>3</sub> (OEt)	OCH <sub>2</sub>	SiCH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	NCH <sub>2</sub>	ArH	NH	NH	ArH	COOH
DMF	1,19 (t, 9)	3,60 (q, 6)	0,68 (sl ou m, 2)	1,64 (sl ou m, 2)	3,20 (m, 2)	6,63 (d, 2);	7,85 (sl, 1)	7,40 (sl, 1)	7,73 (d, 2).	-
THF	1,13 (t, 9)	3,73 (q, 6)	0,57-0,51 (m, 2)	1,53-1,41 (m, 2)	3,05 (q, 2)	7,46 (d, 2)	8,75 (sl, 1)	6,28 (t, 1)	7,78 (d, 2)	12,44 (sl,1).
Literatura [129]	1,15 (t, 9)	3,75 (q, 6)	0,56 (t, 2)	1,48 (q, 2)	3,07 (q, 2)	7,47 (d, 2)	8,79 (sl, 1)	6,31 (t, 1)	7,78 (d, 2)	12,45 (sl,1).

Onde: sl= singlete; d= duplete; t= tripleto; q= quadruplete; m= multiplete e o número entre parênteses indica o número de H obtidos pela integração.

Comparando os deslocamentos químicos apresentados pelo 4-AMBS\_THF com os obtidos por Zhang *et al.* [129], é plausível afirmar a formação do agente sililante, já que os valores dos deslocamentos químicos são praticamente iguais, conforme pode ser visto nas duas últimas linhas da Tabela 7.

#### 4.2.1.4. Espectrometria de massas

Foi feita a análise por espectrometria de massas do 4-AMBS\_DMF e 4-AMBS\_THF.

Para o 4-AMBS\_DMF, o espectro foi obtido em alta resolução em um equipamento AutoSpace híbrido EBE da Micromass, por inserção direta com ionização por elétrons, em uma faixa de varredura de massas de 50 a 550. O espectro de massas comprovou a presença do íon molecular para o agente sililante  $m/z$  384 e a existência de DMF  $m/z$  73.

Já para o 4-AMBS\_THF, o espectro foi obtido em alta resolução em um equipamento Xevo Q-TOF da Waters, por infusão direta com ionização eletrospray negativa, numa faixa de varredura de massas de 350 a 25. O espectro de massas confirmou a presença do íon molecular  $m/z$  383,2.

### 4.3. Derivatização do monolito de sílica

Independente do tipo de agente sililante utilizado, é impossível conseguir reagir todos os grupos silanóis presentes na superfície da sílica. Mesmo quando um agente monofuncional é utilizado, empregando condições de reação otimizadas, o grau de recobrimento geralmente não ultrapassa o valor de  $4 \mu\text{mol m}^{-2}$  em sílicas cromatográficas devido ao impedimento estérico na reação com os agentes sililantes. Este valor indica que apenas 50% dos silanóis disponíveis reagem, considerando que a concentração média dos silanóis é da ordem de  $8 \mu\text{mol m}^{-2}$  [133].

Estes números indicam a dificuldade experimental que se pode ter para recobrir a superfície de um monolito de sílica. Neste trabalho também foi obtido baixo recobrimento, mas mesmo nestas condições as colunas funcionalizadas apresentaram propriedades adequadas para separação de alguns analitos por ECC.

#### 4.3.1. Caracterização do monolito funcionalizado

##### 4.3.1.1. Análise elementar

Realizou-se a análise elementar do monolito de sílica antes e depois da funcionalização com o 4-AMBS\_DMF por 3, 6 e 48 h, obtendo os resultados apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Comparação dos resultados obtidos na análise elementar para os monolitos de sílica antes e depois da funcionalização com o 4-AMBS\_DMF.

	Sílica sem funcionalizar			Sílica funcionalizada				
	*	**	***	3 h*	6 h*	6 h**	6 h***	48 h**
%C	0,4	0,1	0,4	6,2	11,6	10,5	1,7	10,3
%H	1,6	-	0,4	1,9	2,7	1,5	0,5	0,5
%N	0,2	-	0,1	2,4	4,1	2,4	0,4	2,2

Sílicas obtidas em: \*2007, \*\*2009 e \*\*\*2010

As sílicas funcionalizadas apresentaram um aumento significativo nas percentagens de C, H e N, indicando que a derivatização da sílica ocorreu com sucesso. Por outro lado, o aumento no tempo de funcionalização após 6 h não aumentou o teor de recobrimento no monolito.

As sílicas funcionalizadas apresentaram variações e valores divergentes quando comparadas no mesmo tempo de reação (6 h). O que foi observado é que nos materiais preparados em 2009 e 2010, o recobrimento da coluna foi menor quando comparado com as fases funcionalizadas em 2007. A principal diferença entre os materiais era a pureza do agente sililante. Este comportamento levantou a hipótese de que o resíduo da síntese do agente sililante, como a TEA ou o DMF, contribuía para o aumento da funcionalização do monolito de sílica.

#### 4.3.1.2. Porosidade e área superficial por adsorção de nitrogênio (ASAP)

Foi realizada a determinação do volume e da área de poro para cinco fases estacionárias, duas sem funcionalizar e três funcionalizadas em diferentes tempos de reação, 3, 6 e 48 h. Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 9.** Comparação dos resultados das áreas superficiais ( $S_{\text{BET}}$ ), área recoberta ( $\chi$ ), volumes e diâmetro de poro da sílica antes e depois da funcionalização com o 4-AMBS\_DMF.

	Monolito*	Monolito funcionalizado* 3 h	Monolito funcionalizado* 6 h	Monolito**	Monolito funcionalizado** 6 h
$S_{\text{BET}} / \text{m}^2\text{g}^{-1}$	950	550	625	612	543
Volume de poro $/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	0,5	0,3	0,3	0,9	0,9
Diâmetro de poro/ Å	19,6	18,9	19,2	58,4	67,5
$\chi/\mu\text{mol m}^{-2}$	-	0,55	1,15	-	0,21

Sílicas obtidas em: \*2007 e \*\*2010

Como era esperado, a área superficial das sílicas funcionalizadas foi menor que a área da sílica sem funcionalizar. Este fenômeno é comumente observado na funcionalização de sílicas para CLAE e é aproveitado em conjunto com a análise

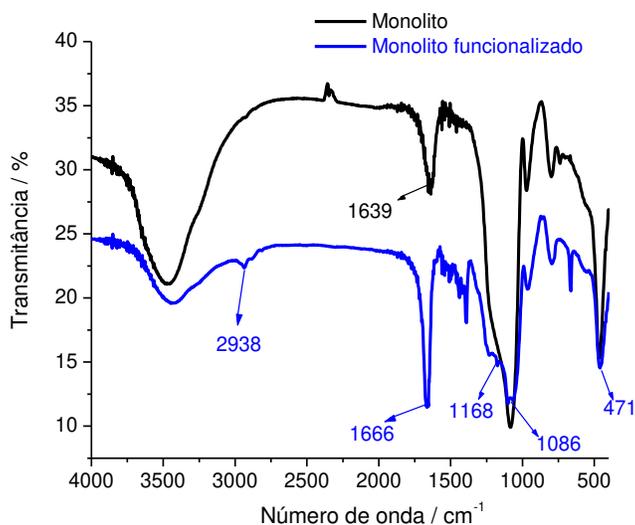
elementar para determinar a porcentagem de área recoberta, conforme a equação de Berendsen *et al.* [134]

$$\chi (\mu\text{molm}^{-2}) = \frac{10^6 \times \%C}{1200N_c - \%C(M-3)} \times \frac{1}{S_{\text{BET}}} \quad \text{Eq. 12}$$

onde  $\chi$  é a superfície recoberta,  $N_c$  é o número de átomos de carbono presente no 4-AMBS (11),  $M$  é a massa molar do silano ligado a superfície da sílica ( $221 \text{ g mol}^{-1}$ ), três é um número que indica que o silano é trifuncional e  $S_{\text{BET}}$  ( $950 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) é a área superficial da sílica sem funcionalizar. O valor de  $1,15 \mu\text{mol m}^{-2}$  para a sílica funcionalizada por 6 h (de 2007) é um valor pequeno se comparado com os valores típicos obtidos para sílicas cromatográficas, que são da ordem de  $4 \mu\text{mol m}^{-2}$ . Mas, mesmo com baixo recobrimento, as colunas funcionalizadas apresentaram comportamento diferente das colunas não funcionalizadas durante as avaliações eletroforéticas por ECC, como será apresentado nos próximos itens.

#### 4.3.1.3. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho do monolito antes e após a funcionalização com o 4-AMBS\_DMF são apresentados na Figura 28.



**Figura 28.** Espectro de infravermelho para o monolito antes e depois da derivatização em DMF.

No espectro da sílica funcionalizada, é possível notar a presença da banda de  $\text{-C=O}$  em  $1666\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo ureia; bandas finas na região de  $1550\text{ cm}^{-1}$  relativas à ligação  $\text{NH}$ ; banda de  $\text{-CH}_2$  em  $2938\text{ cm}^{-1}$  e banda em  $1168\text{ cm}^{-1}$ , oriunda da ligação  $\text{C-Si}$ , sobreposta com a banda em  $1086\text{ cm}^{-1}$  referente aos estiramentos assimétricos do grupo  $\text{Si-O-Si}$ . Estas bandas confirmaram a derivatização do monolito.

#### **4.4. Avaliação eletroforética das colunas monolíticas**

Além da caracterização física das FE desenvolvidas, funcionalizadas e sem funcionalização, elas foram avaliadas em separações eletroforéticas para saber como a funcionalização das colunas influenciava nas separações de alguns compostos.

Basicamente, foi avaliado se as colunas apresentavam uma linha de base estável e, se a partir dos valores da mobilidade efetiva dos analitos e da mobilidade do FEO, era possível distinguir as interações provenientes da partícula monolítica e/ou da funcionalização, além de verificar se as FE eram capazes de separar uma mistura de analitos.

##### **4.4.1. Avaliação eletroforética usando detector condutométrico sem contato ( $\text{C}^4\text{D}$ )**

No início deste trabalho, em 2005, não existiam artigos publicados que combinavam colunas monolíticas de sílica com o detector  $\text{C}^4\text{D}$ . Em 2008, Kubáň *et al.* [125] sintetizaram uma série de colunas tubulares abertas e as aplicaram na separação de cátions por ECC com detecção  $\text{C}^4\text{D}$ . Os autores observaram variação na seletividade das colunas em função do número de camadas do polímero que recobria a coluna. Além disso, estudaram a mudança da seletividade em função do eletrólito de corrida, mantendo fixo o valor do pH em 2,72, a corrente gerada no capilar foi  $750\text{ }\mu\text{A}$  e a força iônica em  $2,0\text{ mmol L}^{-1}$ . Os autores também calcularam o fator de retenção, o qual aumentou com o acréscimo do recobrimento da coluna. Os autores conseguiram separar cinco cátions ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,

Cs<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>) em menos de 5,5 min em uma coluna com quatro camadas de recobrimento e seis cátions (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Li<sup>+</sup>) em 5 min, com uma coluna de duas camadas. Os autores mediram a repetibilidade do trabalho em função do tempo de migração, alturas de pico e áreas de pico sendo, 0,5%, 4,5% e 6,1%, respectivamente.

Em 2009, Mai *et al.* [135] avaliaram três colunas: uma coluna monolítica de sílica C18, sintetizada pelo grupo, outra coluna monolítica de sílica C18 capeada comercial (Merck) e uma terceira coluna capilar vazia, com detecção C<sup>4</sup>D. Os autores conseguiram separar os cátions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Li<sup>+</sup> em 4 min, oito aminos em menos de 5 min com a coluna preparada pelo grupo e onze aminoácidos com a coluna comercial (lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, valina, leucina, serina, treonina, fenilalanina, ácido aspártico). No trabalho, os autores estudaram a variação do modificador orgânico (metanol) na FM e o ajuste do pH em 3,4, 3,5 e 2,25 com uma solução tampão entre 20 e 40 mmol L<sup>-1</sup> de ácido acético.

Ainda não existe na literatura uma fase estacionária semelhante à proposta no presente trabalho para separações de cátions por ECC. A avaliação desta fase estacionária usando o parâmetro cromatográfico fator de retenção implicaria na obtenção de valores negativos, já que o sinal do FEO aparece só depois da saída dos íons positivos. Por tal motivo, preferiu-se avaliar as colunas a partir das mudanças de mobilidade de cada analito.

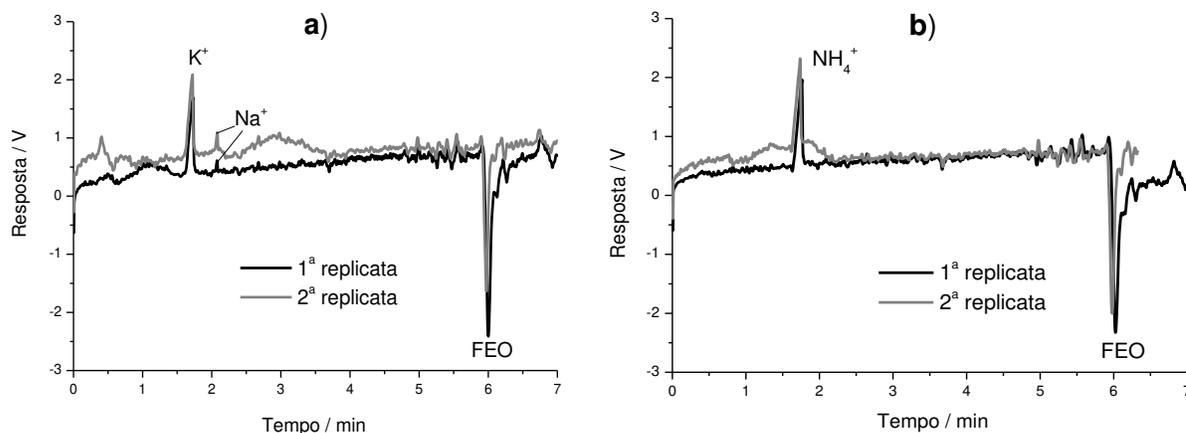
Para fazer a identificação dos analitos foram feitas as injeções dos analitos separadamente e, em seguida, das misturas, para que fosse possível identificar cada analito no eletroferograma. Para garantir que o equipamento estivesse funcionando corretamente, sempre foram feitas comparações simultâneas usando o capilar de sílica vazio.

#### **4.4.1.1. Avaliação eletroforética do monolito sem funcionalizar**

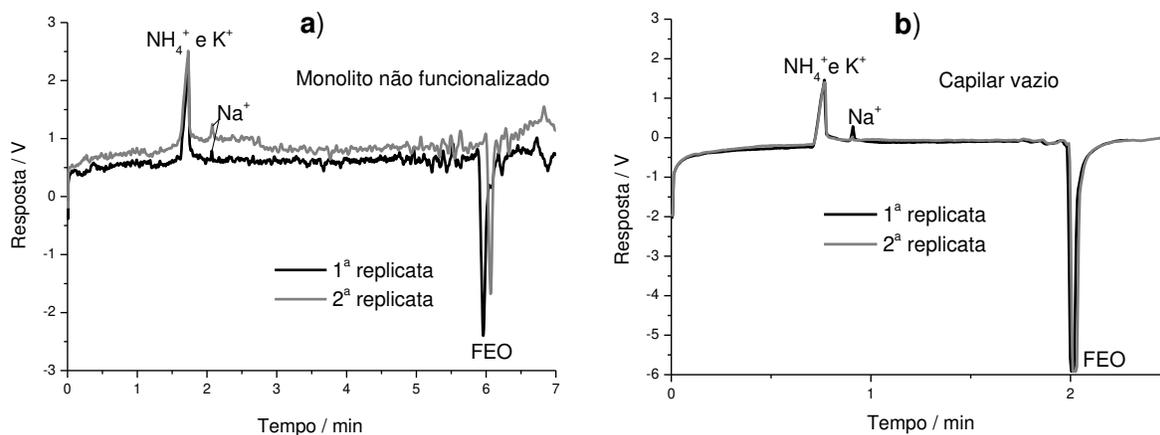
A coluna monolítica sem funcionalização de 50 µm d.i. foi condicionada com tampão 25 mmol L<sup>-1</sup> tris/ácido acético, pH 7,5. Para o condicionamento da coluna, foi aplicada uma rampa de voltagem que partiu de 5 kV e atingiu 25 kV com

incrementos de 5 kV, obtendo-se uma variação nos valores de corrente de 2,1 a 12,6  $\mu\text{A}$ , sendo que para o capilar vazio a corrente gerada com este tampão foi de 18  $\mu\text{A}$ . Esta variação no valor de corrente pode ser explicada pela característica da corrente elétrica, que é uma variável que depende da quantidade de íons transportados. No capilar vazio, o eletrólito tem um caminho livre onde podem ser transportados os íons, já o capilar preenchido com o monolito tem uma série de canais onde também são transportados os íons, mas com menos espaços livres.

Uma vez condicionada a coluna, fizeram-se injeções dos cátions  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  separadamente (Figura 29) e da mistura (Figura 30a). Para comparação, foi realizada a injeção da mistura dos cátions em um capilar de sílica vazio (Figura 30b). Como ambos os cátions têm características eletroforéticas semelhantes (mobilidade, tamanho e carga), não houve separação nestes capilares nestas condições, pois o mecanismo de separação tanto no capilar vazio como no monolito sem funcionalizar dependem exclusivamente da diferença das características eletroforéticas.



**Figura 29.** Eletroferogramas das injeções de a)  $\text{K}^+$  e b)  $\text{NH}_4^+$  1  $\text{mmol L}^{-1}$ . Monolito sem funcionalizar d.i. de 50  $\mu\text{m}$  e 50 cm de comprimento; tampão: 25  $\text{mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocínica: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV; 25,1  $^\circ\text{C}$ ; detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando a 453 kHz; 3,1  $V_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.



**Figura 30.** Eletroferogramas de 2 injeções da mistura de  $K^+$  e  $NH_4^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; empregando: a) Monolito sem funcionalizar  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 50 \text{ cm}$  e b) Capilar vazio  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 44 \text{ cm}$ . Tampão:  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 7,5, injeção eletrocínica, 3 s, 5 kV. Potencial 25 kV;  $25,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $C^4D$  funcionando a 453 kHz,  $3,1 \text{ V}_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.

Conhecendo-se as dimensões dos capilares,  $L = 50 \text{ cm}$ ;  $l = 40 \text{ cm}$  para o monolito sem funcionalizar e  $L = 44 \text{ cm}$ ;  $l = 34 \text{ cm}$  para o capilar vazio, além da voltagem aplicada,  $V = 25000 \text{ V}$ , foi possível calcular as mobilidades aparentes e efetivas para cada analito. Os resultados estão na Tabela 10.

**Tabela 10.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $K^+$  e  $NH_4^+$  na coluna monolítica sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5. \*

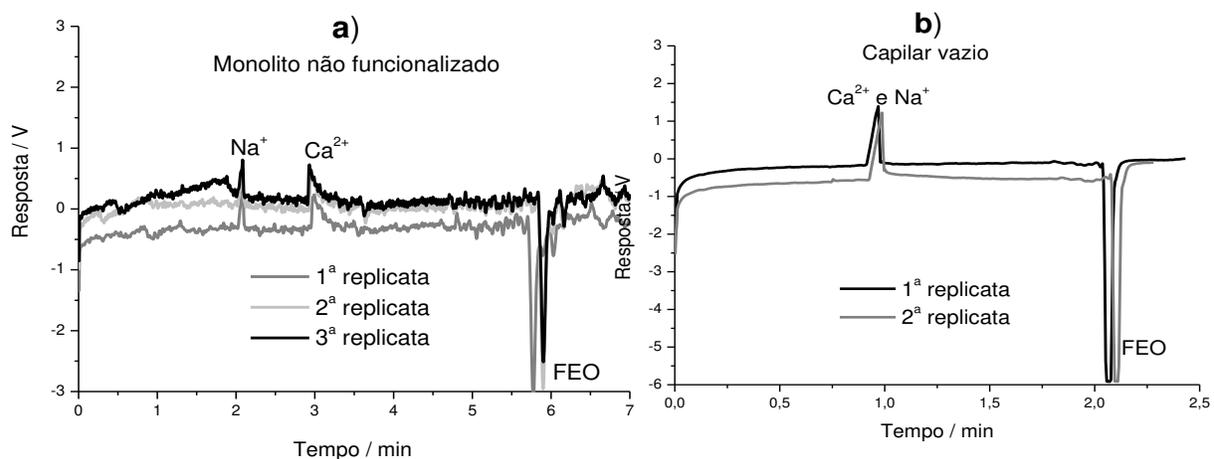
Mobilidades	Monolito sem funcionalizar / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %
$\mu_a K^+$	77,3	0,2	129,9	0,2
$\mu_a NH_4^+$	76,4	0,8	129,9	0,2
$\mu_{FEO}$	22,3	0,2	49,6	0,5
$\mu_{ef} K^+$	55,0	0,5	80,3	0,009
$\mu_{ef} NH_4^+$	54,1	1,1	80,3	0,009

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

O valor da mobilidade do FEO no capilar vazio ( $49,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) é maior do que no monolito sem funcionalizar ( $22,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ). Isto era esperado, já que no capilar vazio tem-se uma parede contínua e livre que permite gerar o fluxo eletrosmótico quase sem efeitos de retardamento. Por outro lado, o monolito de sílica também é um caminho contínuo, que igualmente tem grupos silanóis que permitem gerar o FEO, porém a partícula monolítica é cheia de poros e caminhos que retardam o FEO, diminuindo, assim, o valor da mobilidade.

Os valores das mobilidades efetivas para os cátions  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  no monolito sem funcionalizar são menores do que as mobilidades apresentadas no capilar vazio, significando que existe um fator de retardamento (caminhos múltiplos) que está influenciando ambos os cátions com a mesma intensidade. Contudo, esse fator não ajuda na separação dos cátions.

Realizou-se uma injeção da mistura dos cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  esperando-se um resultado semelhante ao obtido com os cátions anteriores. Entretanto, o resultado foi diferente, conforme pode ser observado nos eletroferogramas da Figura 31, já que os analitos se separaram na coluna monolítica sem funcionalizar.



**Figura 31.** Eletroferogramas de três injeções da mistura de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; a) Monolito não funcionalizado com  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 55 \text{ cm}$  e b) Capilar vazio com  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 44 \text{ cm}$ ; tampão:  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 7,5; injeção electrocinética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando a 453 kHz,  $3,1 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

Na Tabela 11 estão apresentadas as mobilidades aparentes e efetivas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

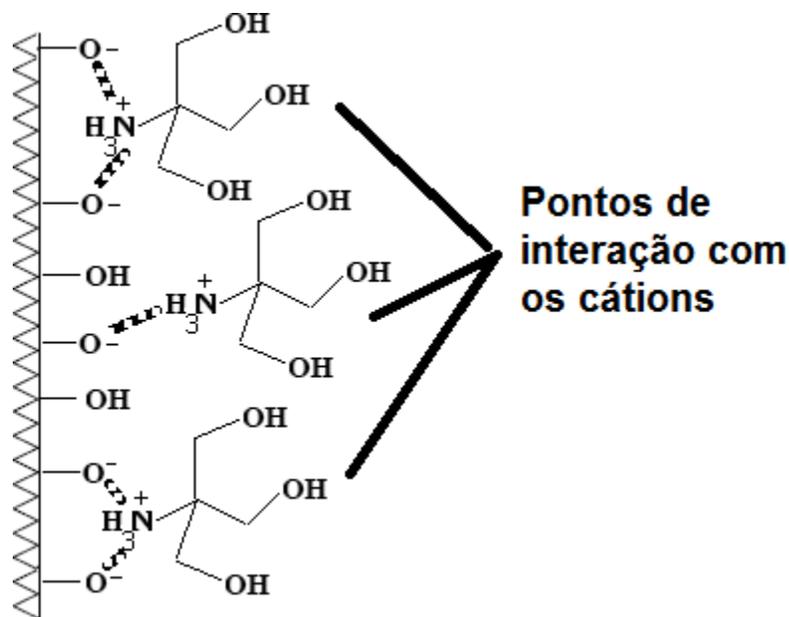
**Tabela 11.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na coluna monolítica sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5. \*

Mobilidades	Monolito sem funcionalizar / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %
$\mu_a \text{ Na}^+$	79,2	0,3	102,0	0,9
$\mu_a \text{ Ca}^{2+}$	55,9	0,9	102,0	0,9
$\mu_{FEO}$	28,2	1,2	47,9	1,0
$\mu_{ef} \text{ Na}^+$	51,0	1,1	54,1	0,8
$\mu_{ef} \text{ Ca}^{2+}$	27,7	2,9	54,1	0,8

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

Comparando as mobilidades efetivas do íon sódio na coluna sem funcionalizar e no capilar vazio, é possível verificar que o  $\text{Na}^+$  é pouco retido na coluna sem funcionalizar, já que os valores de mobilidade entre as duas colunas variaram levemente. Ao fazer a mesma comparação para o íon cálcio, o valor da mobilidade no monolito é menor do que no capilar vazio ( $27,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1} < 54,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ), o que indica uma interação do íon cálcio com o monolito. Neste caso, a interação com a fase estacionária ajudou na separação dos cátions.

Para explicar a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com o monolito sem funcionalizar, propõe-se que o tampão tris seja adsorvido na superfície do monolito (Figura 32), criando pontos de interação diferenciais, o que explicaria a separação dos cátions e a necessidade de longos períodos de tempo para condicionamento da FE monolítica.



**Figura 32.** Esquema da adsorção do tampão tris na superfície do monólito.

Um aspecto que reforça a adsorção do tris na superfície do monólito é a variação dos valores de  $\mu_{FEO}$  para o monólito em dias diferentes, como mostra a Tabela 12. No monólito sem funcionalizar, houve uma variação no valor de  $\mu_{FEO}$  que é de  $5,9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$  e no capilar vazio de  $-1,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$ . Este último valor é característico das medições empregando o detector  $C^4D$ . Assim, a variação no valor da mobilidade do monólito sem funcionalizar ocorre devido à variação da quantidade adsorvida do tris no monólito.

**Tabela 12.** Mobilidades do FEO no monólito sem funcionalizar e no capilar vazio, pH 7,5.\*

Coluna	Monólito sem funcionalizar		Capilar vazio	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
$\mu_{FEO} / \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$	22,3	28,2	49,6	47,9
<b>CV / %</b>	0,3	1,2	0,5	1,0

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

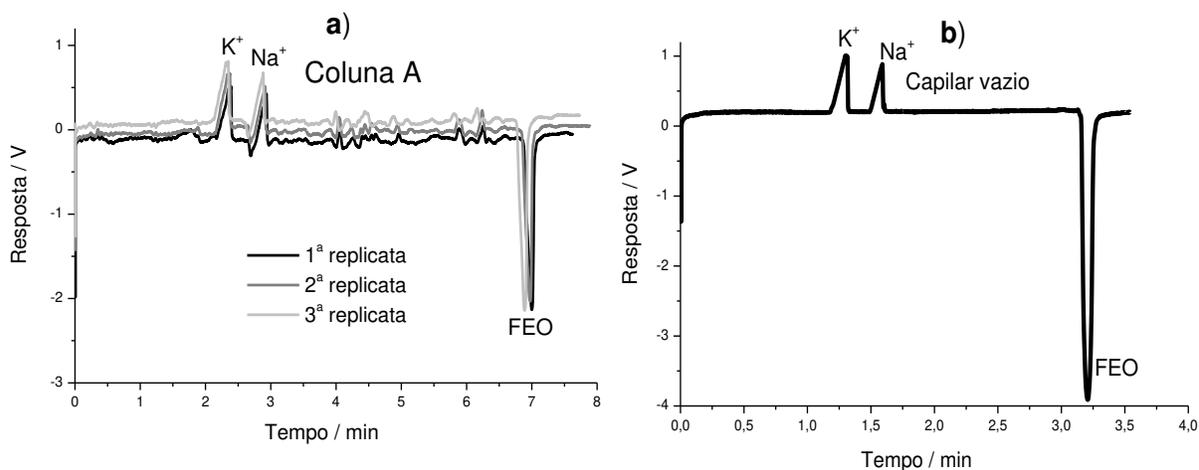
#### 4.4.1.2. Avaliação eletroforética do monolito funcionalizado

A Tabela 13 descreve as características das colunas monolíticas preparadas e caracterizadas por eletroforese capilar empregando detectores condutométrico sem contato (C<sup>4</sup>D) ou de ultra-violeta (UV).

**Tabela 13.** Características das fases estacionárias funcionalizadas.

Coluna	Diâmetro interno / $\mu\text{m}$	Tempo de silanização / h	Solvente de preparação	Caracterização eletroforética	
				Detector	Analitos separados
<b>A</b>	50	6	MeOH	C <sup>4</sup> D	Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup>
<b>B</b>	50	6	DMF	C <sup>4</sup> D	Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e K <sup>+</sup>
<b>C</b>	75	6	MeOH	C <sup>4</sup> D	Aminoácidos
<b>D</b>	50	6	DMF	C <sup>4</sup> D	Aminoácidos
<b>E</b>	50	6	DMF	UV	Fármacos
<b>F</b>	50	6	THF	UV	Fármacos

De maneira análoga à coluna monolítica sem funcionalização, foi feito o condicionamento da coluna monolítica funcionalizada (Coluna A) e posterior avaliação eletroforética com uma mistura teste dos cátions de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> na concentração 1 mmol L<sup>-1</sup>. Na Figura 33 são apresentados os eletroferogramas obtidos na coluna monolítica e no capilar vazio. A Tabela 14 apresenta as mobilidades de cada cátion nas colunas testadas.



**Figura 33.** Eletroferogramas da mistura teste de  $K^+$  e  $Na^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; tampão: pH 7,5,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; a) Coluna A de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 60 \text{ cm}$  e b) Capilar de sílica vazio de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$ . Detector  $C^4D$  funcionando em  $583 \text{ kHz}$  e  $1,3V_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

**Tabela 14.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $K^+$  e  $Na^+$  na coluna monolítica funcionalizada (Coluna A) e no capilar vazio, pH 7,5.

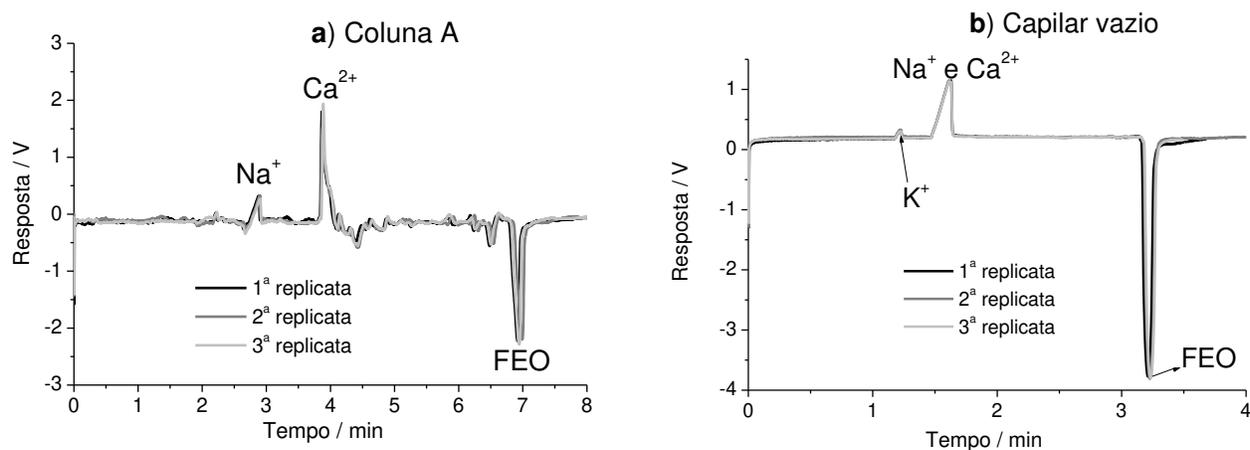
Mobilidades	Monolito funcionalizado / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$
$\mu_a K^+$	85,5	0,9	159,0
$\mu_a Na^+$	68,7	0,7	104,0
$\mu_{FEO}$	28,8	-	51,4
$\mu_{ef} K^+$	56,7	-	108,0
$\mu_{ef} Na^+$	40,0	-	52,3

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

Analisando o eletroferograma, o íon  $K^+$  está menos retido que o íon  $Na^+$ . Porém, quando são comparadas as mobilidades efetivas obtidas no capilar vazio

com as mobilidades efetivas dos analitos na coluna monolítica funcionalizada, pode ser observado que houve uma diminuição nas mesmas, sugerindo interações dos analitos com a FE. A interação de  $K^+$  foi maior na FE do que a interação de  $Na^+$ , quando comparado com o capilar vazio, já que a mobilidade do  $K^+$  passou de  $108 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  do capilar vazio para  $57 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  na coluna monolítica. Deve-se lembrar que o íon sódio teve pouca interação com o monolito não funcionalizado, sendo que sua mobilidade quase não variou, passando de  $54 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  no capilar vazio para  $51 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  no monolito não funcionalizado. Já com o monolito funcionalizado, a mobilidade desse íon passou de  $52 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  no capilar vazio para  $40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  e este aumento na interação com a FE foi atribuído à derivatização do monolito de sílica.

Também foram avaliados os íons  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ , os quais possuem mobilidades semelhantes e que não são separados por eletroforese capilar em zona nestas condições de trabalho. Os eletroferogramas obtidos com a mistura teste composta por íons  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  estão apresentados na Figura 34 e as mobilidades calculadas estão na Tabela 15.



**Figura 34.** Eletroferogramas da mistura teste de  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Tampão: pH 7,5,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV;  $25,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ; a) Coluna A de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 60 \text{ cm}$ , b) Capilar de sílica vazio de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$ . Detector  $C^4D$  funcionando em  $583 \text{ kHz}$  e  $1,3 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

**Tabela 15.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na coluna A monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.

Mobilidades	Monolito funcionalizado / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %
$\mu_a \text{ Ca}^{2+}$	51,6	0,3	101,8	0,04
$\mu_a \text{ Na}^+$	69,1	0,4	101,8	0,04
$\mu_{\text{FEO}}$	28,8	0,6	51,2	0,4
$\mu_{ef} \text{ Ca}^{2+}$	22,8	0,5	50,6	0,4
$\mu_{ef} \text{ Na}^+$	40,3	0,4	50,6	0,4

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

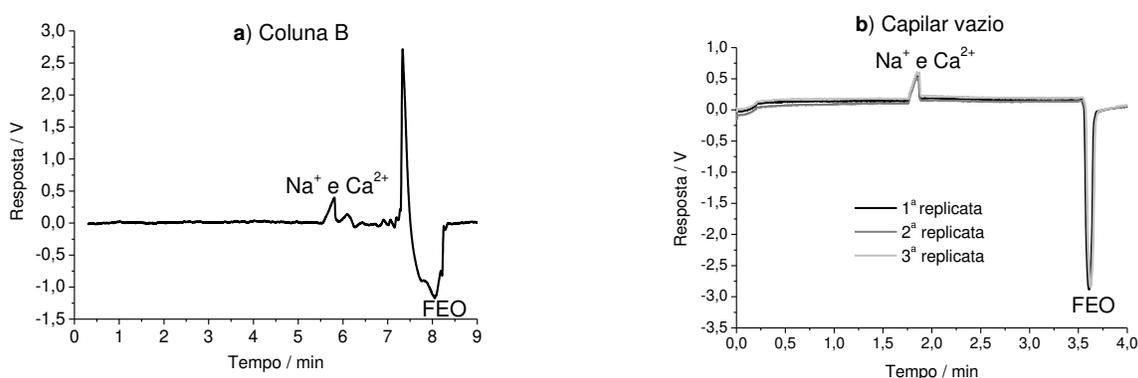
Ao comparar os valores das mobilidades efetivas dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  na coluna monolítica sem funcionalizar (Tabela 11) com os valores da coluna A, é possível notar que existe uma interação maior do íon  $\text{Na}^+$  com a coluna monolítica funcionalizada e que a interação do íon cálcio é levemente maior na coluna funcionalizada do que na coluna não funcionalizada.

Outro fato interessante é que as avaliações com as misturas teste  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , foram realizadas em dias diferentes e os valores da mobilidade do FEO, tanto no monolito funcionalizado quanto no capilar vazio, apresentaram CV de 0,7 e 0,4, conforme os valores apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Mobilidades do FEO no monolito funcionalizado A e no capilar vazio, pH 7,5.

Coluna	Monolito funcionalizado A		Capilar vazio	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
$\mu_{\text{FEO}} / \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	28,8	28,8	51,4	51,2
CV / %	0,7	0,6	-	0,4
<b>Média <math>\mu_{\text{FEO}} / \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}</math></b>	28,8		51,3	

De maneira análoga à coluna monolítica A, foi feito o condicionamento da coluna monolítica B e a injeção da mistura contendo os cátions de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Os eletroferogramas obtidos são apresentados na Figura 35. Como é possível observar, para esta coluna não houve separação do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{Ca}^{2+}$ , diferente da coluna A. Mas houve um aumento significativo no sinal do FEO.



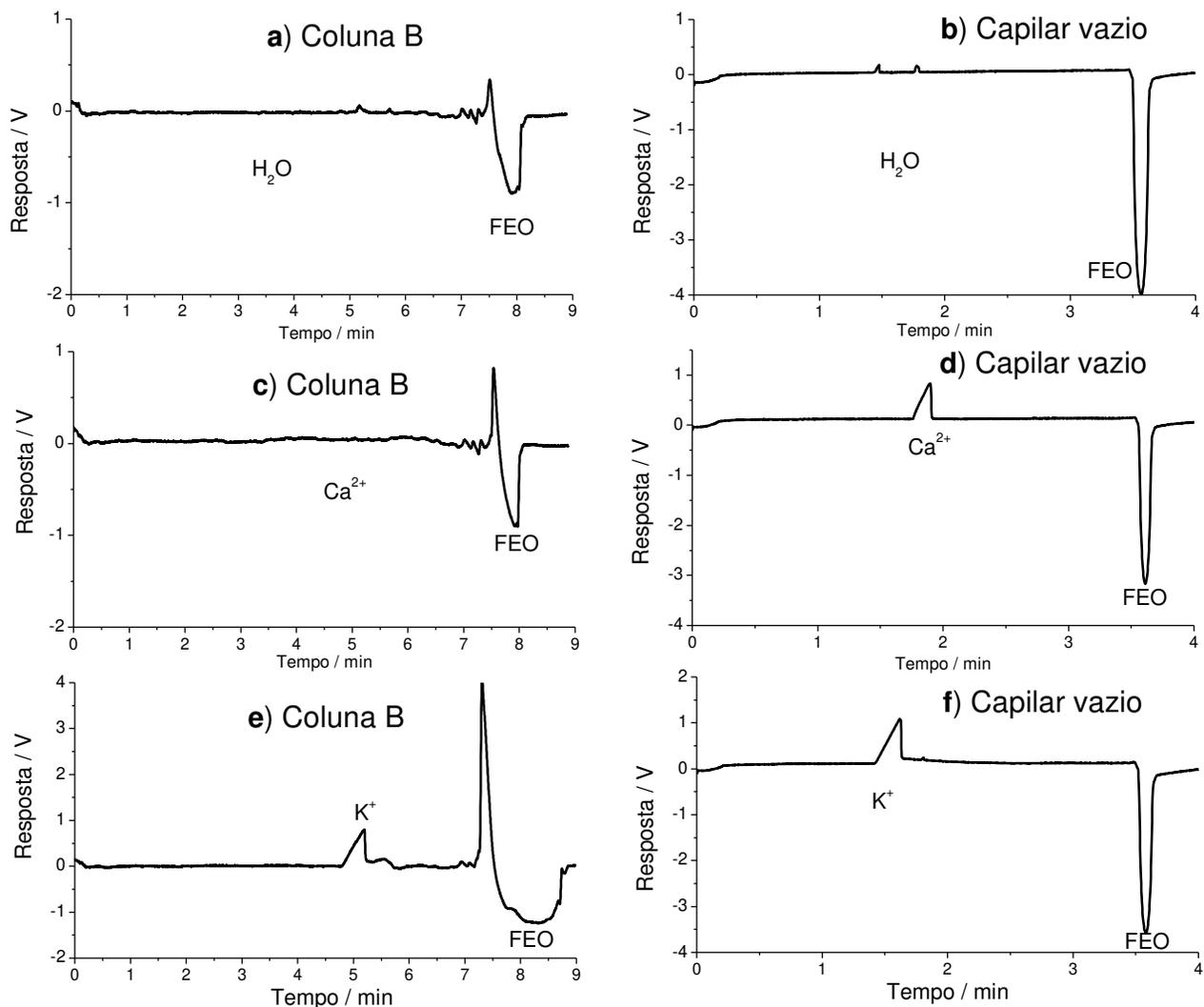
**Figura 35.** Eletroferogramas da mistura de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; tampão:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocínica: 10 s; 5 kV; potencial 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; a) monolito funcionalizado B de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$ ; b) capilar de sílica vazio de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 52 \text{ cm}$ . Detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando em  $555 \text{ kHz}$  e  $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.

Para confirmar que o sinal em torno de 7,5 min era do FEO e não do íon cálcio, foi realizada uma série de injeções com  $\text{H}_2\text{O}$ , íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , nas mesmas condições, na coluna monolítica B. Além disso, foram feitas as mesmas injeções no capilar vazio para comparação, conforme mostra a Figura 36

Com os resultados obtidos nas injeções de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , foram calculadas as mobilidades dos cátions na coluna B e no capilar vazio, Tabela 17.

Como pode ser observado nas Figuras 35a, 35c e 35e, o sinal em torno de 7,5 min é do FEO, o que significa que houve a supressão do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  e, portanto, a retenção do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na coluna B, como aconteceu com as colunas de maior recobrimento no trabalho de Kubáň *et al.* [125]. No trabalho deste grupo, quando as colunas tinham mais de quatro camadas de recobrimento polimérico de ácido maléico, os íons bivalentes eram fortemente retidos e a separação era inviável.

Pelos valores das mobilidades efetivas do íon sódio (Tabela 17), é possível inferir que as interações do  $\text{Na}^+$  são mais fortes na coluna monolítica B do que na coluna monolítica A, indicando que o recobrimento da coluna B é maior.



**Figura 36** Eletroferogramas dos analitos  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e de  $\text{H}_2\text{O}$ ; tampão:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 7,5; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; a), c) e e) monolito funcionalizado B de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$  e b), d) e f) capilar de sílica  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 52 \text{ cm}$ . Detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando em  $555 \text{ kHz}$  e  $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.

Já para o íon potássio, ao comparar o valor da mobilidade na coluna A com os valores da coluna sem funcionalizar (Tabela 10), a mobilidade do íon potássio diminuiu quase pela metade do valor apresentado no capilar vazio. Já no monolito funcionalizado, o valor da mobilidade é quase um quarto do valor da mobilidade apresentada pelo cátion no capilar vazio, indicando uma maior interação do  $K^+$  com o monolito funcionalizado do que com o monolito sem funcionalizar, conforme também foi constatado para o íon  $Na^+$ .

**Tabela 17.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $Na^+$  e  $K^+$  na coluna B monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 7,5.

<b>Mobilidades</b>	<b>Monolito funcionalizado</b> <b>/ <math>\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}</math></b>	<b>CV / %</b>	<b>Capilar vazio /</b> <b><math>\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}</math></b>	<b>CV / %</b>
$\mu_a K^+$	31,6	-	89,3	-
$\mu_a Na^+$	28,1	0,9	78,6	0,1
$\mu_{FEO}$	20,6	0,7	40,2	0,3
$\mu_{ef} K^+$	11,1	-	49,1	-
$\mu_{ef} Na^+$	7,73	1,0	38,4	0,07

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

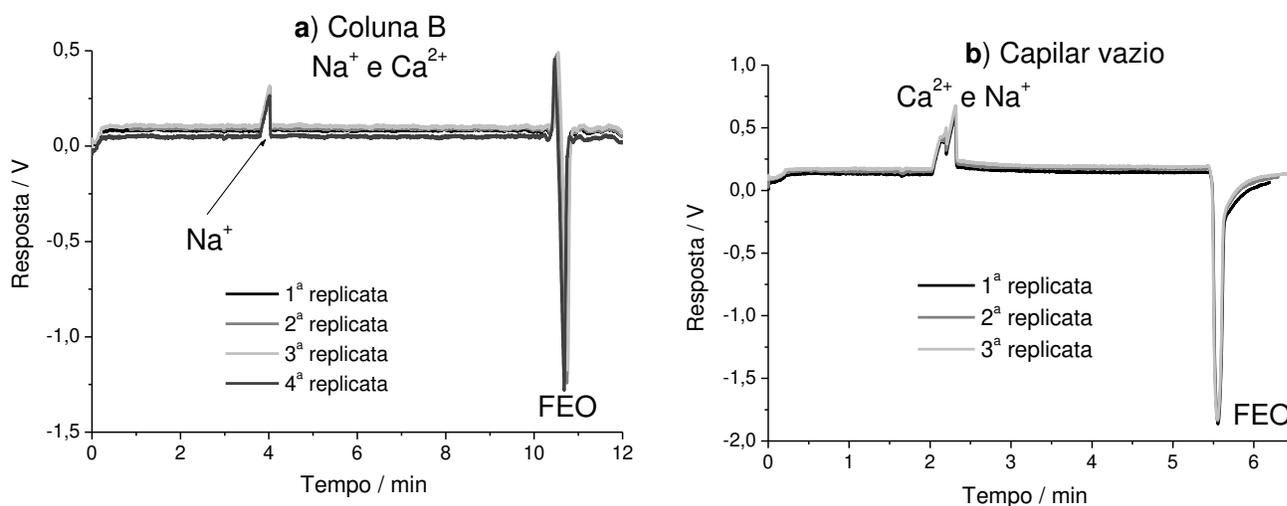
De maneira geral, as interações dos cátions com as colunas funcionalizadas são maiores do que as interações com a coluna monolítica sem funcionalizar. Além disso, o monolito B apresentou maior interação com os cátions  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  do que a coluna A.

Para obter mais informações eletroforéticas sobre a coluna B, o pH foi alterado para 6,0 e o eletrólito de corrida para o tampão 30 mmol  $L^{-1}$  MES/Histidina (His). O objetivo era diminuir o número de grupos ionizados tanto dos silanóis (do monolito de sílica) como dos grupos ácidos (da funcionalização da coluna), permitindo uma interação menor dos cátions da mistura teste com a

coluna. Os eletroferogramas obtidos nessas condições são apresentados na Figura 36 e as mobilidades calculadas estão na Tabela 18.

Como era esperado, o valor da mobilidade do FEO diminuiu devido à mudança de pH, uma vez que se reduziu a ionização dos grupos silanóis. Além disso, neste pH, a interação do íon sódio foi menor do que em pH 7,5. Era esperado que a interação com o íon cálcio também diminuísse e, assim, surgisse o pico do  $\text{Ca}^{2+}$ , pois na coluna vazia, os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  quase se separaram, nas mesmas condições (Figura 37b).

Como pode ser visto, o sinal do íon  $\text{Ca}^{2+}$  novamente não aparece, o que evidencia que a interação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o grupo funcional da coluna monolítica não depende da ionização dos grupos ácidos, sugerindo uma interação de coordenação e não iônica.



**Figura 37.** Eletroferogramas dos analitos  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; tampão:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  MES/His, pH 6,0; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV; a) Monolito funcionalizado B de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$  e b) Capilar de sílica de  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de d.i.  $L = 51,7 \text{ cm}$ ;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando em 555 kHz e  $2,0 \text{ V}_p$ . Equipamento Waters.

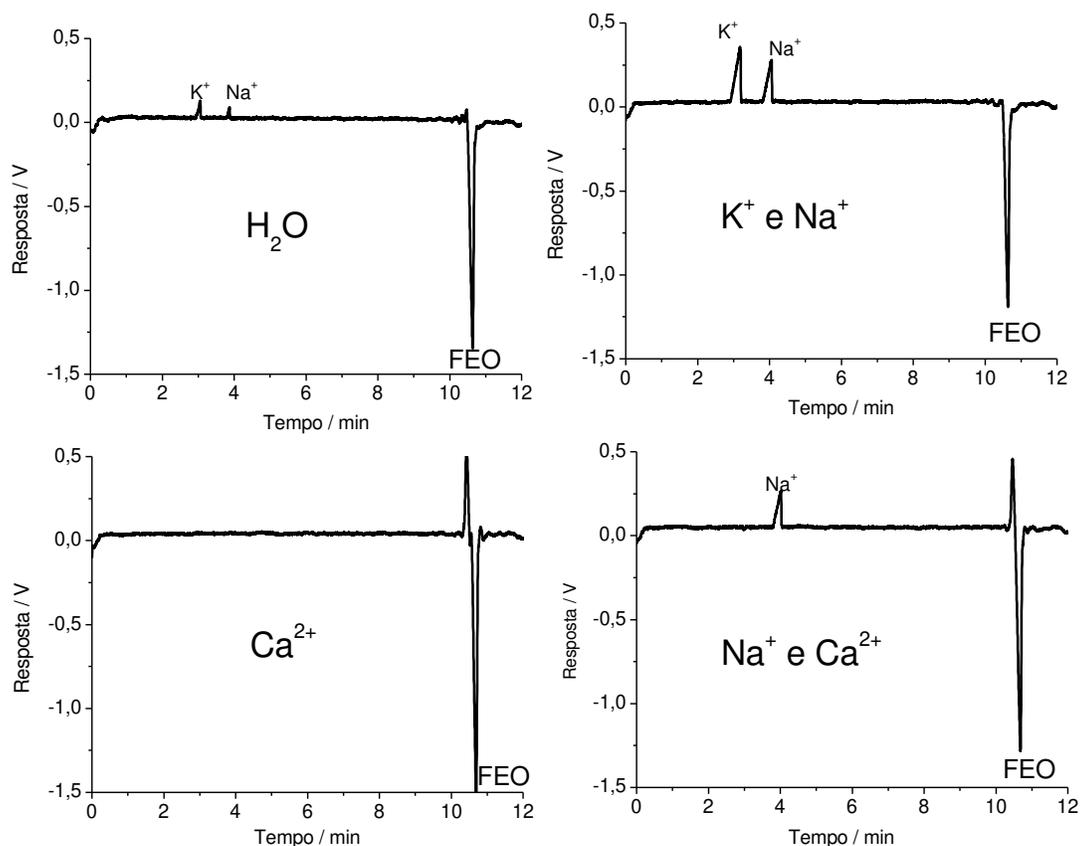
**Tabela 18.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na coluna B monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 6,0.

<b>Mobilidades</b>	<b>Monolito funcionalizado</b> <b>/ <math>\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}</math></b>	<b>CV / %</b>	<b>Capilar vazio /</b> <b><math>\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}</math></b>	<b>CV / %</b>
$\mu_a \text{ Na}^+$	41,1	0,1	66,5	0,2
$\mu_a \text{ Ca}^{2+}$	-	-	62,2	0,1
$\mu_{\text{FEO}}$	15,4	0,3	25,9	0,1
$\mu_{ef} \text{ Na}^+$	25,7	0,3	40,7	0,3
$\mu_{ef} \text{ Ca}^{2+}$	-	-	36,3	0,2

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

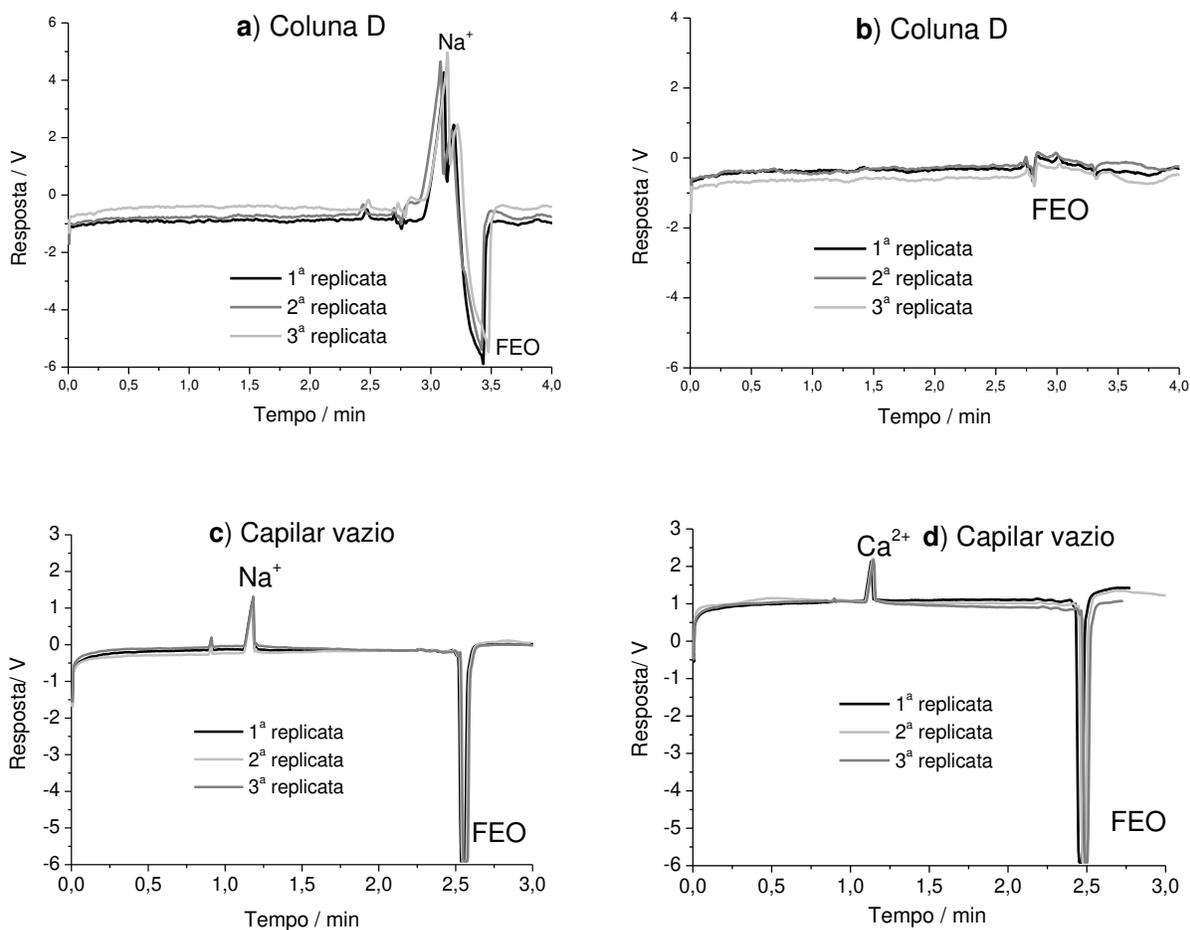
Para finalizar, foi realizada uma série de injeções, nas mesmas condições, ou seja, empregando tampão  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  MES/His em pH 6,0 para corroborar a designação do sinal do FEO, conforme mostra a Figura 38.

Foi possível confirmar que o sinal do FEO era aquele que aparece após 10 min. Devido a estes resultados, concluiu-se que o íon cálcio era retido irreversivelmente pela coluna monolítica B nas condições testadas.



**Figura 38.** Eletroferogramas de injeções dos analitos  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $H_2O$ ; monolito funcionalizado B de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 55 \text{ cm}$ ; tampão:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  MES/his, pH 6,0; injeção eletrocínética: 10 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $C^4D$  funcionando em 555 kHz e  $2,0 V_p$ ; equipamento Waters.

Uma terceira coluna, D, foi testada para a separação dos íons  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$ . Realizaram-se novas injeções dos cátions separadamente na coluna D e no capilar vazio. Na Figura 39 são apresentados os eletroferogramas obtidos.



**Figura 39.** Eletroferogramas de 3 injeções de a)  $\text{Na}^+$  e b)  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; monolito funcionalizado D de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 50 \text{ cm}$ , e 3 injeções de c)  $\text{Na}^+$  e d)  $\text{Ca}^{2+}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; capilar de sílica vazio de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 50 \text{ cm}$ ; tampão:  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético; pH 7,5; injeção eletrocínética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando a 453 kHz;  $3,1 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

Novamente, o pico do íon cálcio não foi visualizado, repetindo o comportamento observado na coluna B. Com estes resultados, foram calculadas as mobilidades do FEO e do íon  $\text{Na}^+$ , valores reunidos na Tabela 19.

O valor da mobilidade de  $\text{Na}^+$  indica uma maior interação com a coluna D que com as colunas A e B.

**Tabela 19.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{Na}^+$  na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.

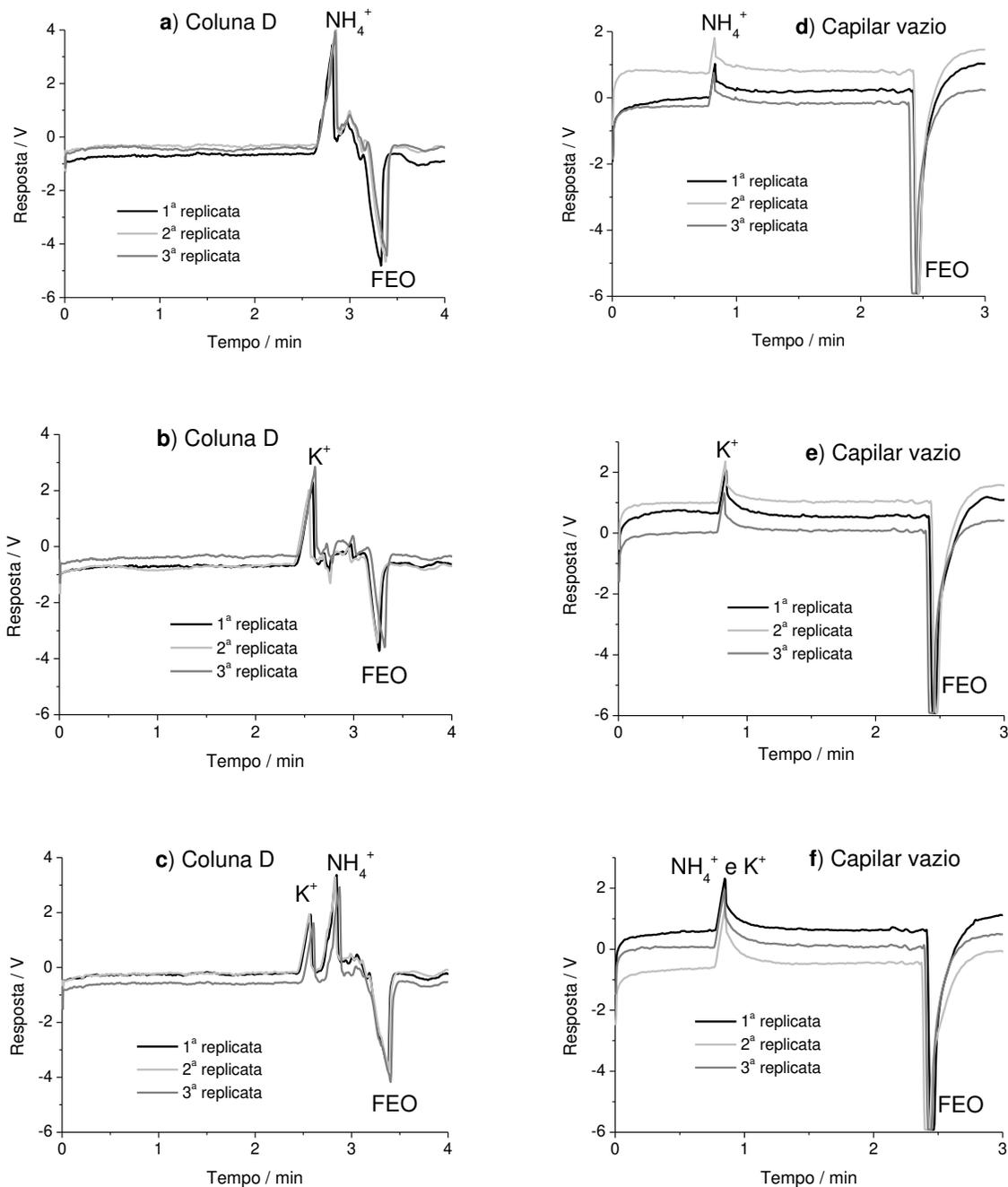
Mobilidades	Monolito funcionalizado / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %
$\mu_a \text{ Na}^+$	42,9	0,9	113,0	0,3
$\mu_{\text{FEO}}$	38,7	0,9	52,2	0,4
$\mu_{ef} \text{ Na}^+$	4,1	2,7	60,8	0,2

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

As colunas A, B e D foram funcionalizadas em datas diferentes, com quantidades de recobrimento diferentes. Assim, o que se observou é que a coluna A, com baixo recobrimento, foi capaz de separar os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  e, as colunas B e D, com maior recobrimento, retiveram o íon  $\text{Ca}^{2+}$  irreversivelmente e aumentaram a interação com o íon  $\text{Na}^+$ , como aconteceu no trabalho de Kubáň *et al.* [125].

Para a coluna D também foi realizada a injeção de cátions de mobilidade alta, como  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ . Simultaneamente, foram realizadas as injeções dos mesmos íons no capilar vazio. Os eletroferogramas são mostrados na Figura 40.

Foi observada uma variação nos tempos de migração entre os cátions na coluna monolítica funcionalizada, sugerindo uma possível separação, que pode ser comprovada com a injeção da mistura dos cátions, apresentada na Figura 38. Com estes resultados, foram calculadas as mobilidades do FEO e dos íons em cada coluna e estas foram listadas na Tabela 20.



**Figura 40.** Eletroferogramas de 3 injeções de a)  $\text{NH}_4^+$ , b)  $\text{K}^+$  e c)  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Coluna D, monolito funcionalizado de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 50 \text{ cm}$  e d)  $\text{NH}_4^+$ , e)  $\text{K}^+$  e f)  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; capilar de sílica vazio de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 44 \text{ cm}$ , tampão:  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 7,5; injeção eletrocínica: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $\text{C}^4\text{D}$  funcionando em 453 kHz;  $3,1 \text{ V}_p$ , equipamento desenvolvido no laboratório.

**Tabela 20.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio, pH 7,5.

Mobilidades	Monolito funcionalizado / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	CV / %
$\mu_a \text{ K}^+$	51,8	1,1	121,0	0,6
$\mu_a \text{ NH}_4^+$	47,1	0,6	120,0	1,0
$\mu_{\text{FEO}}$	39,6	1,0	40,7	0,7
$\mu_{ef} \text{ K}^+$	12,2	5,7	80,6	1,1
$\mu_{ef} \text{ NH}_4^+$	7,42	2,7	79,4	1,7

\*As mobilidades apresentadas são as médias das triplicatas e o coeficiente de variação (CV) correspondente.

Os valores das mobilidades obtidos experimentalmente permitem concluir que a separação dos íons, nestas condições, não é viável no capilar vazio. Este fato foi confirmado pela injeção simultânea dos cátions mostrada na Figura 40 f.

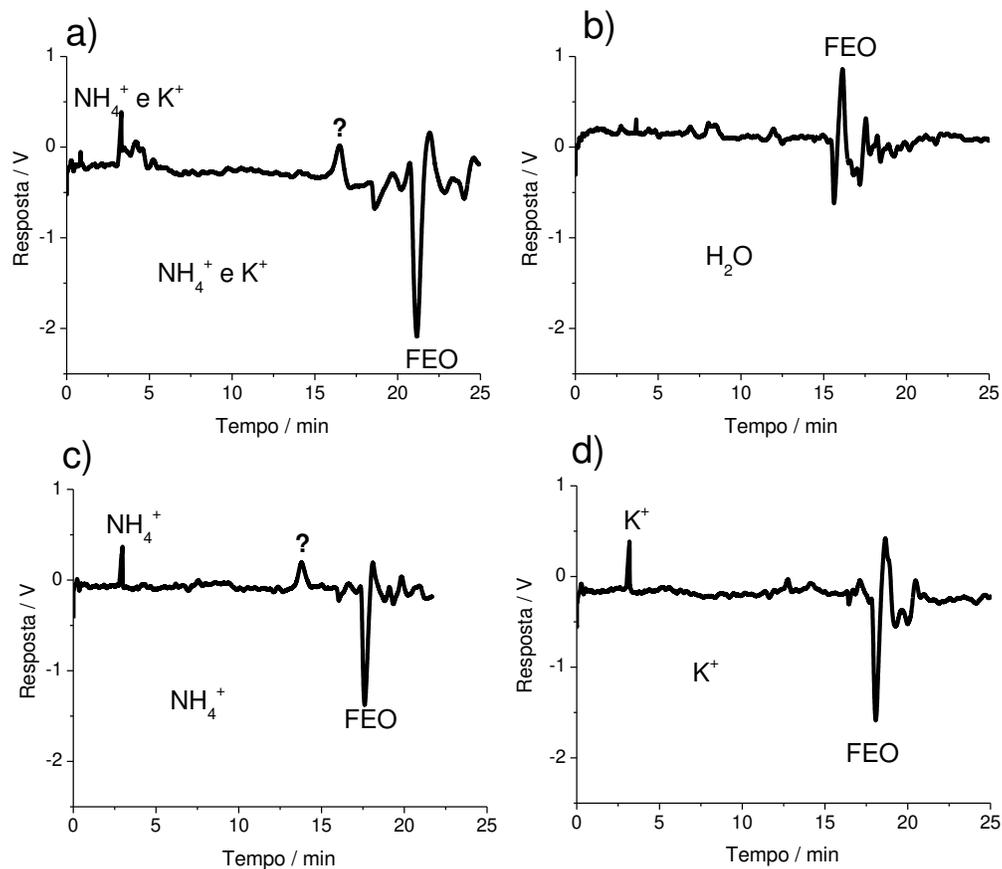
Por outro lado, as mobilidades de ambos os íons diminuíram consideravelmente no monolito funcionalizado. A variação foi maior para o íon  $\text{NH}_4^+$ , que apresenta maior interação com a fase estacionária.

A partir deste resultado de separação dos cátions, na ausência de aditivos, pode-se comprovar o sucesso desta nova FE para uso em ECC pois, como apresentado na Figura 30, os mesmos íons não são separados em uma coluna sem funcionalizar. Em outras palavras, os íons  $\text{NH}_4^+$  interagiram com os íons do ácido carboxílico da fase funcionalizada e não com os silanóis residuais.

Para obter mais informações do comportamento eletroforético da coluna D, fez-se uma mudança de valor de pH, empregando tampão 25 mmol  $\text{L}^{-1}$  ácido acético/tris, pH 4,5. A Figura 41 apresenta os eletroferogramas obtidos para uma injeção de água, injeção dos cátions  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  1 mmol  $\text{L}^{-1}$  e para a mistura deles.

Em pH 4,5, a maioria dos grupos silanóis não está ionizada, o que diminui a quantidade de íons presentes na dupla camada, dificultando o transporte dos íons

e, conseqüentemente, de moléculas do solvente. Com isto, a intensidade do sinal do FEO diminuiu, aumentando o tempo de saída do mesmo. Ambos os fenômenos foram observados neste experimento, já que a intensidade do sinal do FEO passou de 5 V para 1,5 V e seu tempo de retenção de 3,5 min para 18 min.



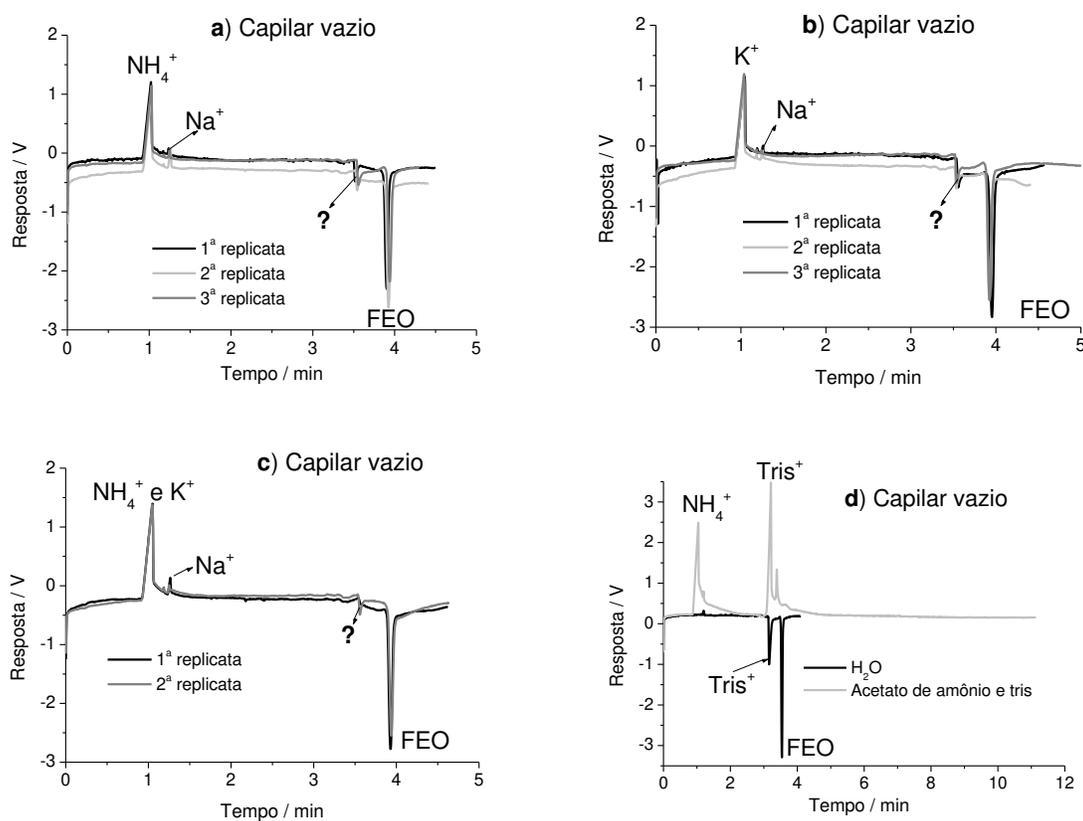
**Figura 41.** Eletroferogramas de injeções dos analitos: a)  $K^+$  e  $NH_4^+$ , b)  $H_2O$ , c)  $NH_4^+$  e d)  $K^+$  1 mmol  $L^{-1}$ ; monolito funcionalizado D de 50  $\mu m$  de d.i. e 50 cm de comprimento; tampão: 25 mmol  $L^{-1}$  ácido acético/tris, pH 4,5; injeção eletrocínica: 3 s, 5 kV; potencial: 25 kV; 25  $^{\circ}C$ ; detector  $C^4D$  funcionando em 453 kHz; 3,1  $V_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

Por outro lado, na injeção do íon  $NH_4^+$  apareceram dois sinais, sendo que apenas um sinal era esperado. Um destes sinais está no mesmo tempo de

retenção do  $K^+$  (3 min), pico estreito e outro pico largo em 13,8 min, com um tempo de retenção que não é próximo ao do FEO (18 min) (Figura 41 c).

Para entender o resultado, realizaram-se uma série de injeções de  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $H_2O$ , acetato de amônio e  $tris^+$  no capilar vazio, as quais estão apresentadas na Figura 42.

Com a Figura 42 pode-se observar que os íons  $NH_4^+$  e  $K^+$  possuem o mesmo tempo de migração e que um sinal um pouco antes do FEO foi detectado. Na Figura 42d, com a injeção do acetato de amônio e  $tris$ , foi possível identificar o sinal do íon  $tris^+$ .



**Figura 42.** Eletroferogramas de injeções dos analitos: a)  $NH_4^+$ , b)  $K^+$ , c)  $NH_4^+$  e  $K^+$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e d) acetato de amônio, tris e  $H_2O$  qualitativa; capilar de sílica de  $50 \mu\text{m}$  de d.i. e 44 cm de comprimento; tampão:  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  ácido acético/tris, pH 4,5; injeção eletrocínética: 3 s, 5 kV; potencial 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector  $C^4D$  funcionando em 453 kHz;  $3,1 \text{ V}_p$ ; equipamento desenvolvido no laboratório.

A partir dos valores dos tempos de migração, foram calculadas as mobilidades dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  a pH 4,5, os quais estão apresentados na Tabela 21.

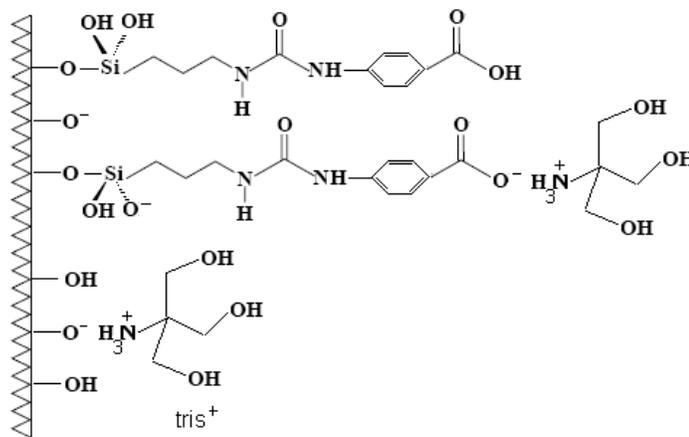
**Tabela 21.** Mobilidades aparentes ( $\mu_a$ ) e efetivas ( $\mu_{ef}$ ) de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  na coluna D monolítica funcionalizada e no capilar vazio; pH 4,5.

Mobilidades	Monolito funcionalizado / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$	Capilar vazio / $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$
$\mu_a \text{ K}^+$	42,4	95,9
$\mu_a \text{ NH}_4^+$	42,4	97,2
$\mu_{\text{FEO}}$	7,04	25,3
$\mu_{ef} \text{ K}^+$	35,4	70,6
$\mu_{ef} \text{ NH}_4^+$	35,4	71,9

Pelos valores das mobilidades, é possível concluir que a separação dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  na coluna monolítica funcionalizada não é viável neste pH, já que ambos os cátions apresentam a mesma mobilidade e a mesma interação com a fase estacionária.

Uma possível explicação para o fato do sinal do tris ser positivo, ou seja, o cátion está mais concentrado do que está no tampão, é que dentro da coluna tem-se uma mistura dos cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{tris}^+$ . O  $\text{tris}^+$ , por entrar primeiro na coluna, condicionada com tampão por várias horas, interage com os grupos silanóis livres e com os grupos ácidos da fase estacionária, conforme apresentado na Figura 43. Quando a amostra é injetada, parte dos íons  $\text{NH}_4^+$  realizam uma troca com os grupos negativos ocupados pelo íon  $\text{tris}^+$  liberando o mesmo e dando origem ao sinal em 13,8 min (Figura 40 c). Outra parte dos íons  $\text{NH}_4^+$  passa livremente, pois

os grupos silanóis e/ou os grupos ácidos já estão saturados com  $\text{NH}_4^+$ , e o amônio em excesso origina o sinal em 3 min.



**Figura 43.** Representação esquemática da fase funcionalizada e sua interação com os íons  $\text{tris}^+$  presentes na solução tampão.

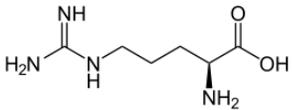
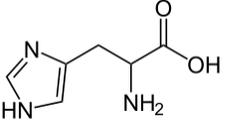
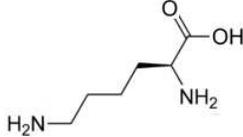
Contudo, se o raciocínio anteriormente mencionado for verdadeiro, surge a dúvida de porque este comportamento não se repete para o íon potássio. De fato, se for observado com maior cuidado o eletroferograma da injeção do íon potássio, pode distinguir-se um pequeno sinal no tempo de retenção do íon  $\text{tris}^+$ . Este sinal não chega a ser tão significativo pelo fato de não estar sendo usada pressão para provocar a movimentação da fase móvel pela coluna e sim uma diferença de potencial. Ou seja, para este cátion, as forças eletroforéticas são maiores do que as do mecanismo de troca iônica.

#### 4.4.1.3. Injeção dos aminoácidos arginina, histidina e lisina no monolito funcionalizado

A fim de continuar com a caracterização da fase monolítica, foi proposta a mudança de analitos e de pH. Para isso foi feito um levantamento bibliográfico de trabalhos usando a detecção condutométrica sem contato em eletroforese em zona como referência para planejar os experimentos. Tanyanyiwa *et al.* [136] lograram separar 20 aminoácidos em meio ácido (pH 2,3-2,8) e meio básico (pH 10,8). Já Coufal *et al.* [137] conseguiram a separação de 21 aminoácidos em pH 2,1. Baseados na literatura, foi proposto o emprego dos aminoácidos

chamados básicos, arginina (Arg), histidina (His) e lisina (Lis), como mistura teste (Tabela 22).

**Tabela 22.** Estruturas e pKa dos aminoácidos Arg, His e Lis.

Símbolo	Estrutura	pKa <sub>1</sub> (COOH)	pKa <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )	pKa <sub>3</sub> Grupo-R	Em pH 5
<b>Arg</b>		2,03	9,00	12,10	<b>Arg<sup>+</sup></b>
<b>His</b>		1,70	9,09	6,04	<b>His<sup>+</sup> e His</b>
<b>Lis</b>		2,15	9,16	10,67	<b>Lis<sup>+</sup></b>

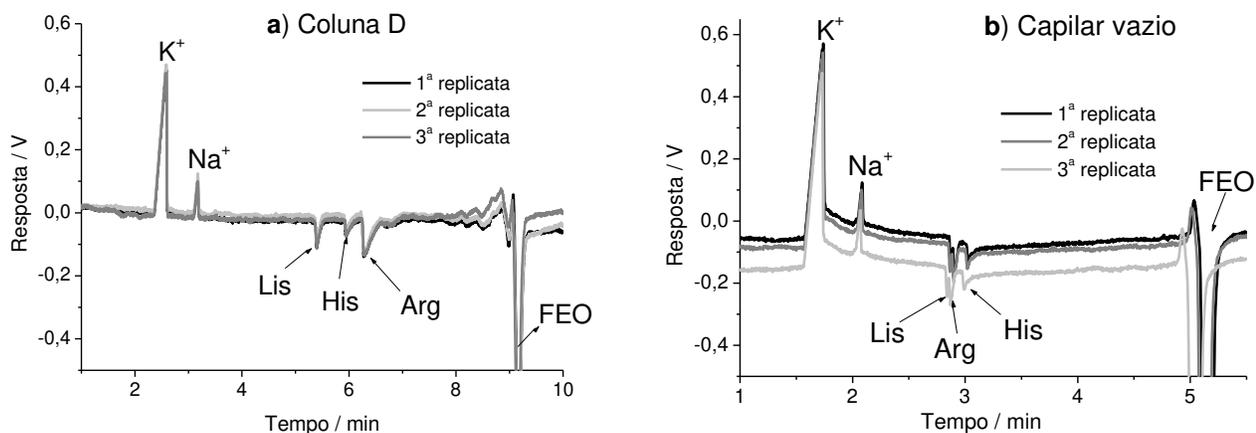
Em valor de pH igual a 5 era esperado que os grupos carboxílicos da FE estivessem ionizados e permitissem a interação dos aminoácidos, que estariam parcialmente protonados, com a FE.

A separação dos aminoácidos foi avaliada com a coluna C e verificou-se que a separação ocorria, porém, o calor produzido durante as corridas não era efetivamente dissipado empregando o equipamento 1, já que a linha de base e, principalmente, os sinais não eram reproduzíveis. Por tal motivo esta avaliação foi realizada com capilares de 50 µm de d.i..

A solução de aminoácidos foi injetada na coluna D de 50 µm de d.i. A Figura 44 apresenta os eletroferogramas obtidos na separação dos aminoácidos Arg, His e Lis 1 mmol L<sup>-1</sup> no monolito funcionalizado e no capilar vazio, respectivamente.

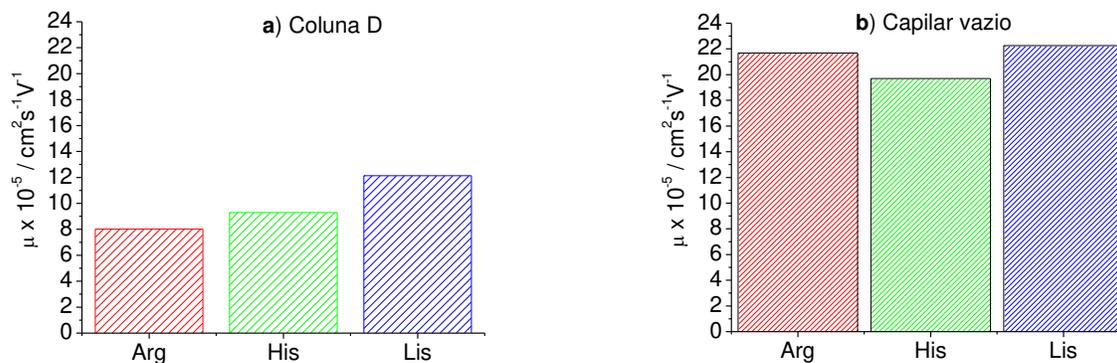
Como é possível notar na Figura 44, foi observada uma melhor separação dos compostos ao usar a coluna monolítica contendo a FE desenvolvida neste trabalho, o que, provavelmente, é devido à interação dos aminoácidos com os grupos carboxílicos da fase estacionária, sendo que os primeiros dois sinais são de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> presentes na água da solução. Além disso, houve uma inversão na

ordem de eluição entre a histidina e a arginina no capilar vazio e na coluna funcionalizada D.



**Figura 44.** Eletroferogramas da mistura teste de Arg, His e Lis  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; em **a)** monolito funcionalizado D de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 54 \text{ cm}$ , **b)** capilar de sílica vazio de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 51,7 \text{ cm}$ ; tampão:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 5,0; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detector C<sup>4</sup>D funcionando em 555 kHz e  $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.

Na Figura 45 são apresentados os valores das médias das mobilidades efetivas para cada modalidade de separação.



**Figura 45.** Mobilidades efetivas  $\mu$  de Arg, His e Lis  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; em **a)** Monolito funcionalizado D de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 54 \text{ cm}$ , **b)** Capilar de sílica vazio de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.,  $L = 51,7 \text{ cm}$ ; tampão:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tris/ácido acético, pH 5,0; injeção eletrocinética: 10 s, 5 kV; potencial: 25 kV;  $25^\circ\text{C}$ ; detector C<sup>4</sup>D funcionando em 555 kHz e  $2,0 \text{ V}_p$ ; equipamento Waters.

Pode-se verificar a diferença entre as mobilidades dos analitos, fenômeno responsável pela diferença na ordem de eluição em cada modalidade de separação, confirmando a interação dos aminoácidos com a FE. Esta diferença na interação pode estar relacionada com o número de átomos de nitrogênio presentes nos aminoácidos. Assim, a Lis, que só tem dois átomos de nitrogênio, migra em primeiro lugar, depois a His, que tem três e, por último, a Arg, que tem quatro átomos de nitrogênio.

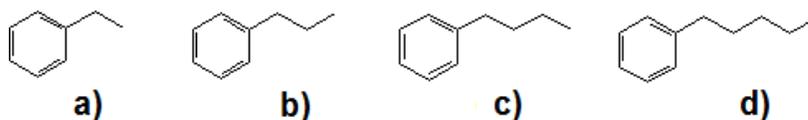
#### 4.4.2 Avaliação eletroforética do monolito funcionalizado usando detector UV

Para realizar a detecção UV em ECC, é necessária a criação de uma janela de detecção no próprio capilar que contém a fase monolítica. Esta não é uma tarefa fácil para monolitos de sílica, já que teria que se fazer um preenchimento parcial dos capilares, o que, experimentalmente implica em uma baixa reprodutibilidade ao longo do leito da coluna. Por isso, avaliou-se a possibilidade de usar a detecção UV com uma cela de alta sensibilidade, pois esta viabiliza o uso de colunas sem janela de detecção no equipamento de EC da Agilent.

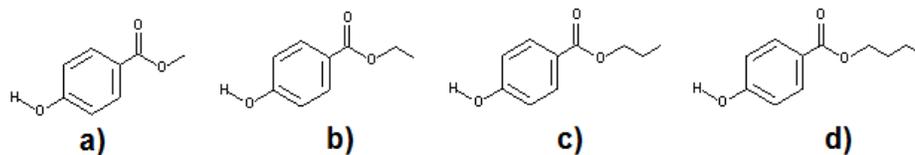
Foram utilizadas duas colunas monolíticas (colunas E e F) nos testes com UV, de 50  $\mu\text{m}$  de d.i., funcionalizadas por 6 h. As colunas foram adaptadas na cela de alta sensibilidade.

##### 4.4.2.1. Separação de compostos neutros

Após estabilização da linha de base empregando a coluna E, foram injetadas misturas de alguns analitos neutros, como alquilbenzenos (Figura 46) e alquilparabenos (Figura 47).

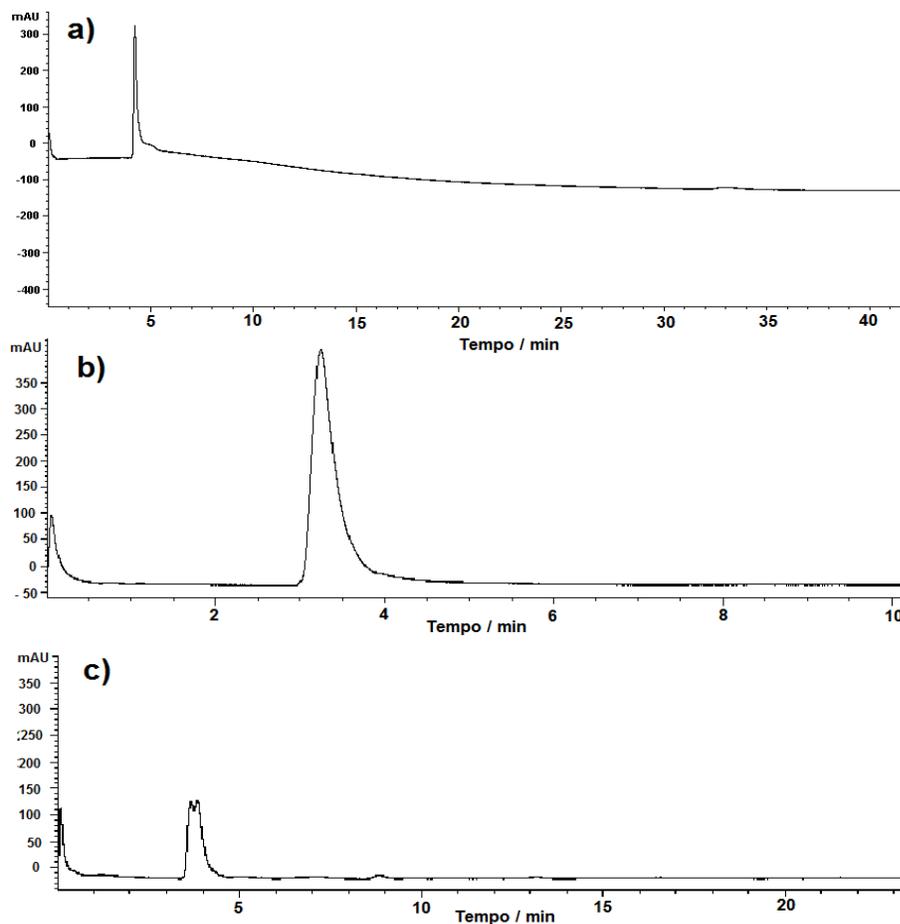


**Figura 46.** Estruturas de a) etilbenzeno, b) propilbenzeno, c) butilbenzeno e d) pentilbenzeno.



**Figura 47.** Estruturas de a) metilparabeno, b) etilparabeno, c) propilparabeno e d) butilparabeno.

Primeiro, foi injetada a mistura dos benzenos: etil, propil, butil e pentilbenzeno, na concentração de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  com eletrólito ACN/tris 30:70, 50:50 e 70:30 v/v,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,0. Os resultados são apresentados na Figura 49.



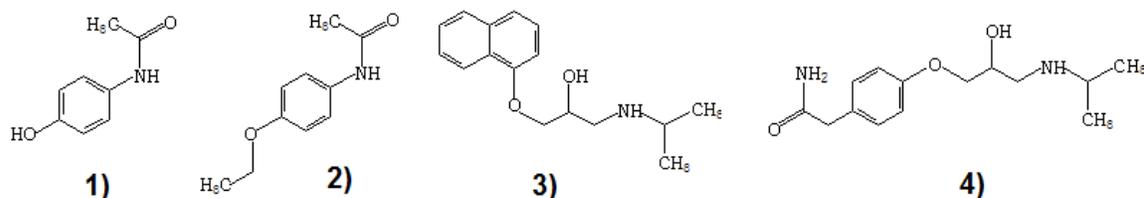
**Figura 48.** Eletroferogramas de injeções de tioureia e alquilbenzenos  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; coluna E de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 40 \text{ cm}$ ; tampão: ACN/tris  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  a) 30:70 v/v, b) 50:50 v/v e c) 70:30 v/v, pH 8,0; injeção eletrocínética: 5 s, 10 kV; potencial: 30 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detecção UV em 214 nm.

Como é possível observar, não houve separação dos compostos em nenhuma das condições testadas.

Ao avaliar a mistura contendo metil, etil, propil e butilparabeno, obtiveram-se resultados similares aos obtidos com os alquilbenzenos, ou seja, não houve separação dos parabenos na coluna monolítica funcionalizada. Após a realização dos experimentos anteriores, pôde-se concluir que a FE proposta neste trabalho não possui seletividade para compostos que variam unicamente na parte apolar da estrutura.

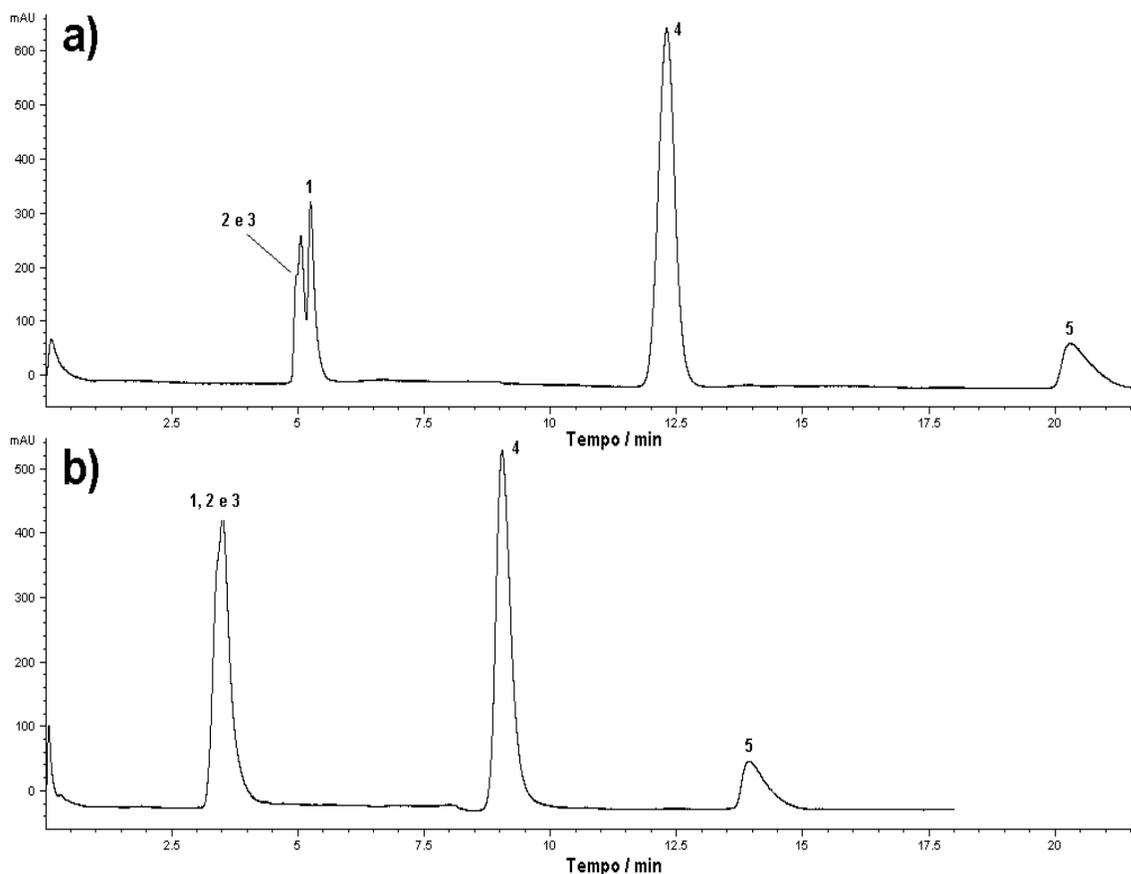
#### 4.4.2.2. Separação de fármacos

Foi realizada a injeção dos fármacos paracetamol, fenacetina, propranolol e atenolol (Figura 49) em diversas condições eletroforéticas.



**Figura 49.** Estruturas de 1) paracetamol, 2) fenacetina, 3) propranolol, 4) atenolol.

A condição que mostrou melhores resultados de separação foi aquela que tem como eletrólito ACN/tris 25 mmol L<sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 7,5. A Figura 50a mostra os eletroferogramas obtidos com os fármacos nestas condições.

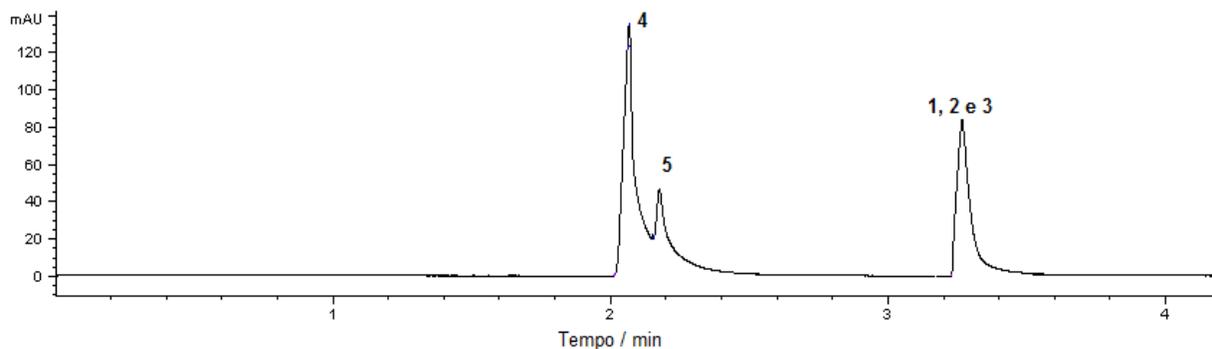


**Figura 50.** Eletroferograma da injeção da mistura de (1) tiourea 5 mmol L<sup>-1</sup>; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 µg mL<sup>-1</sup>; coluna E de 50 µm de d.i. L = 40 cm ; tampão: ACN/tris 25 mmol L<sup>-1</sup> 70:30 v/v, **a)** pH 7,5 e **b)** pH 8,0; injeção electrocinética: 10 s, 5 kV; potencial: 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm.

Pode-se observar que o paracetamol e a fenacetina não foram separados. Estes compostos diferem apenas na cadeia alifática, confirmando a falta de seletividade hidrofóbica da coluna. Já para os fármacos com sítios polares e básicos, a separação foi satisfatória, pois os picos apresentaram uma boa resolução.

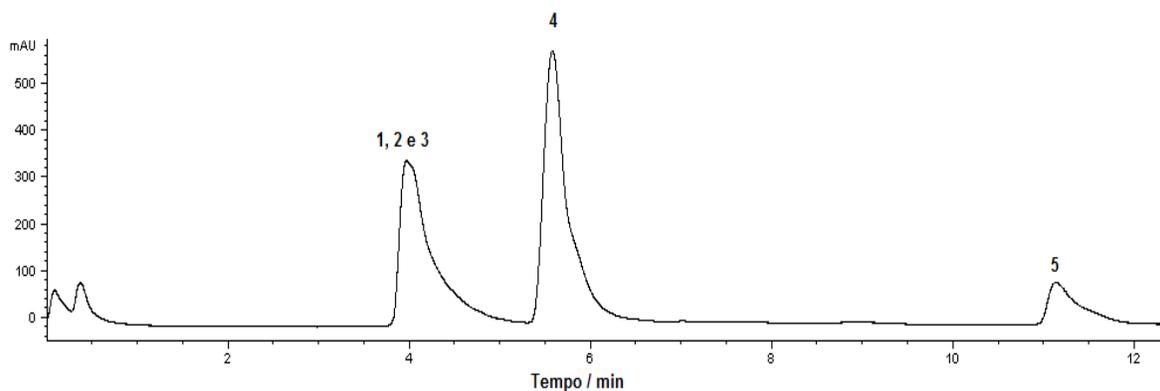
Por outro lado, a mudança no pH do eletrólito de 7,5 para 8,0 diminuiu o tempo de separação devido, provavelmente, ao aumento da mobilidade do FEO e à existência de grupos amina protonados dos fármacos, que ajudaram a reduzir o tempo de análise.

Para comparar os resultados, realizou-se a injeção dos fármacos no capilar vazio (Figura 51). Neste experimento, o propranolol e o atenolol eluíram antes do FEO, indicando que, a pH 7,5, os compostos estão protonados e apresentam mobilidade como cátions.



**Figura 51.** Eletroferogramas de três injeções de (1) tioureia 5 mmol L<sup>-1</sup>; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 µg mL<sup>-1</sup>; Capilar de sílica 50 µm de d.i. L = 70 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L<sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 7,5; injeção eletrocínética: 5 s, 10 kV; potencial 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm.

Uma nova coluna monolítica funcionalizada, F, foi utilizada para efetuar a separação de fármacos. A Figura 52 apresenta os resultados obtidos.



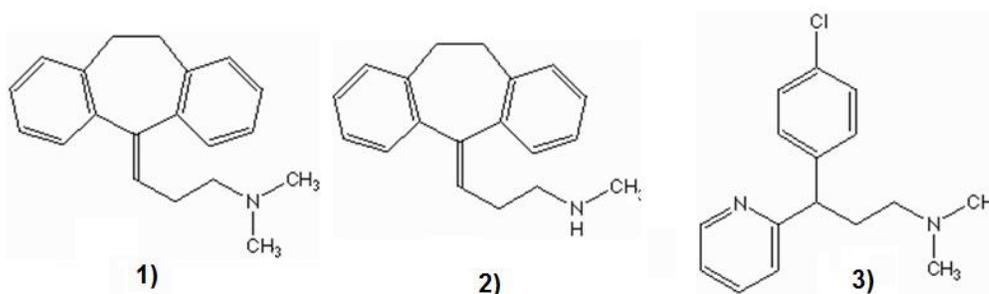
**Figura 52.** Eletroferogramas da injeção da mistura de (1) tioureia 5 mmol L<sup>-1</sup>; (2) paracetamol; (3) fenacetina; (4) propranolol; (5) atenolol 500 µg mL<sup>-1</sup>; Coluna F de 50 µm de diâmetro interno L = 41 cm; tampão: ACN/tris 25 mmol L<sup>-1</sup> 70:30 v/v; pH 8,0; Injeção eletrocínética: 10 s; 5 kV; potencial 30 kV; 25 °C; detecção UV em 214 nm.

Como pode ser observado, a eluição dos fármacos foi mais rápida nesta coluna. Este comportamento pode ser atribuído à variação no recobrimento do monolito (recobrimento menor para a coluna F), pois as colunas têm praticamente as mesmas dimensões (40 cm para a coluna E e 41 cm para a coluna F). Para verificar esta afirmação, foram calculados os fatores de retenção  $k$  dos analitos, os quais estão apresentados na Tabela 23, confirmando que a fase monolítica da coluna F tem menos atração pelos analitos do que a fase da coluna E.

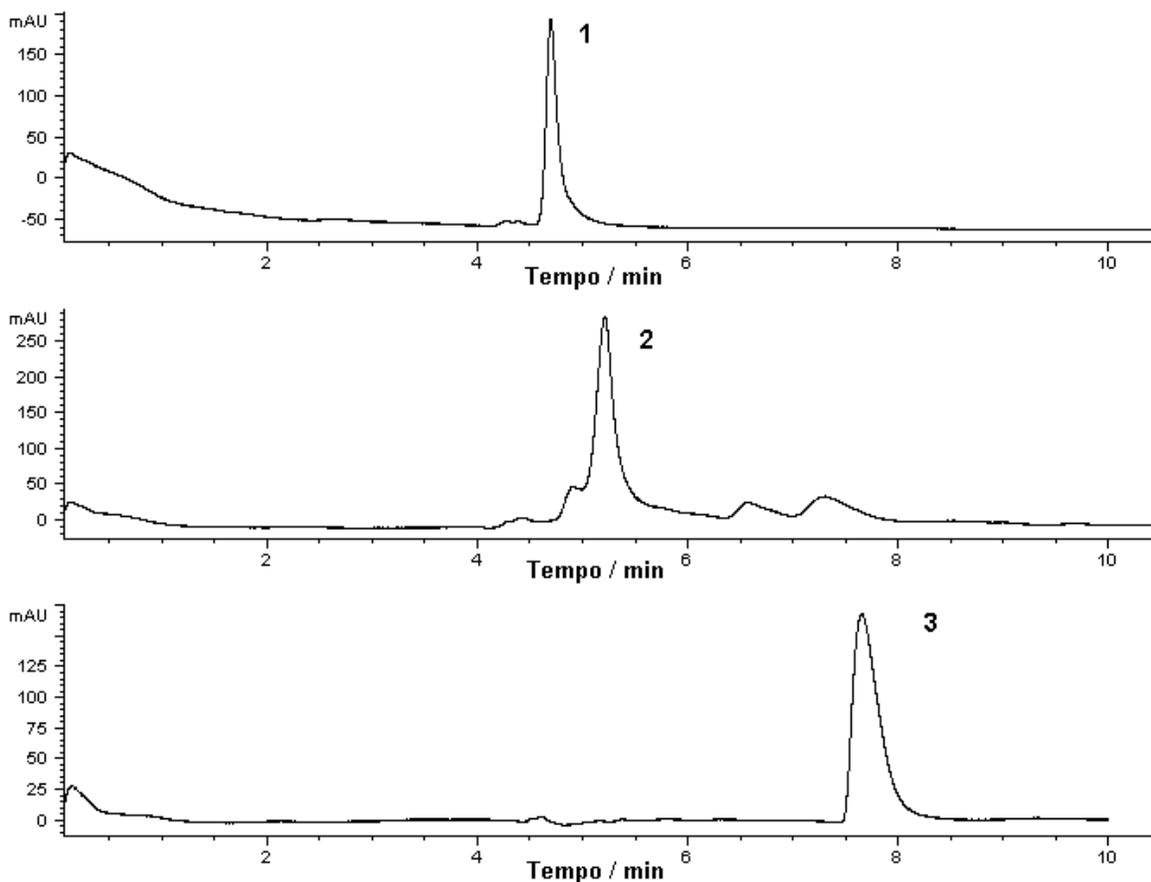
**Tabela 23.** Fatores de retenção ( $k$ ) de tioureia, paracetamol, fenacetina, propranolol e atenolol nas colunas E e F; Tampão: ACN/Tris 25 mmol L<sup>-1</sup> 70:30 v/v, pH 8,0.

	Coluna E	Coluna F
<b>Tioureia, paracetamol e fenacetina</b>	0	0
<b>Propranolol</b>	1,6	0,4
<b>Atenolol</b>	3,0	1,7

Também foi avaliado outro conjunto de fármacos (Figura 53) na coluna monolítica funcionalizada F. A Figura 54 apresenta os eletrocromatogramas obtidos separadamente para cada composto.



**Figura 53.** Estruturas dos fármacos (1) amitriptilina; (2) nortriptilina e (3) clorfeniramina.



**Figura 54.** Eletroferogramas dos fármacos (1) amitriptilina; (2) nortriptilina; (3) clorfeniramina  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Coluna F de  $50 \mu\text{m}$  de d.i.  $L = 38 \text{ cm}$ ; tampão: ACN/tris  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  70:30 v/v, pH 8,0; injeção electrocinética: 5 s, 10 kV; potencial 30 kV;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detecção UV em 214 nm.

De maneira análoga as interações da coluna funcionalizada com os aminoácidos, o fármaco com maior número de átomos de nitrogênio teve maior interação com a fase, sendo ele, neste caso, a clorfeniramina. O ambiente químico do grupo amina dos demais compostos determinou sua interação com a FE. Assim, a amitriptilina, uma amina terciária, teve pouca interação com a FE e eluiu primeiro. A nortriptilina teve maior interação com a FE que a amitriptilina, pois possui um grupo amina secundário. Com estes resultados, é possível inferir que a fase proposta neste trabalho apresenta seletividade para compostos que tenham uma diferença na quantidade de átomos de nitrogênio ou no ambiente químico destes átomos.



# **CAPÍTULO 5**

## **CONCLUSÕES**



## 5. Conclusões

Com os resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que se obteve sucesso na formação das estruturas monolíticas dentro dos capilares de sílica. Com as análises efetuadas, foi possível caracterizar a fase estacionária monolítica formada pelo processo sol-gel.

Em relação ao agente sililante 4-AMBS, foi possível constatar a formação do silano tanto pela via proposta no presente trabalho quanto pela rota de Zhang *et al.*[129]. Além disso, a síntese de Zhang *et al.* proporcionou material de pureza suficiente para caracterizar o agente sililante 4-AMBS\_DMF.

Também foi possível a caracterização da sílica funcionalizada e a constatação de que impurezas de TEA ajudam na obtenção de um maior recobrimento da sílica.

Todas as colunas funcionalizadas apresentaram um bom desempenho na separação dos analitos testados. A diferença entre elas foi na quantidade de silano ligado na superfície do monolito, diferença esta devido à presença ou ausência do TEA no agente sililante.

Mesmo com as diferenças na quantidade de recobrimento das colunas monolíticas, foi possível avaliar a atividade de troca catiônica na separação de cátions e aminoácidos usando a detecção C<sup>4</sup>D e, também, a seletividade da coluna por compostos nitrogenados com a separação de fármacos básicos nos experimentos usando detecção UV.

### Perspectivas de trabalhos futuros

Este trabalho tem características inovadoras pois envolve uma proposta de nova tecnologia para preparação de fases estacionárias monolíticas empregando o método sol-gel. Devido a estas características, esta linha de pesquisa possibilita a continuidade de novos trabalhos como os descritos a seguir:

- Investigar o tempo de silanização necessário para obter o maior recobrimento do monolito de sílica, considerando o emprego de catalisadores em baixas concentrações;
- Aplicar as colunas funcionalizadas na separação de compostos básicos nitrogenados;
- Ampliar os estudos de seletividade da fase estacionária a partir da obtenção de uma fase estacionária mista, empregando por exemplo, o silano 4-AMBS e um trietóxisilano do tipo C18.

**Referências**

- [1] Krull, I. S.; Stevenson, R. L.; Mistry, K.; Swartz, M. E.; *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography*, HNB Publishing: New York, 2000.
- [2] Colón, L. A., Reynolds, K. J., Alicea-Maldonado R., Fermier, A. M.; **Electrophoresis**, 18 (1997) 2162.
- [3] Strain, H.; **J. Am. Chem. Soc.**, 61 (1939) 1292.
- [4] Strain, H. and Sullivan; **J. Anal. Chem.**, 23 (1951) 816.
- [5] Berraz, G.; **An. Asoc. Quim. Arg.**, 31 (1943) 96.
- [6] Tiselius, A.; **Disc. Faraday Soc.**, 7 (1949) 7.
- [7] Synge, R. L. M.; **Disc. Faraday Soc.**, 7 (1949) 164.
- [8] Mould, D. L., Synge, R. L. M.; **Analyst.**, 77 (1952) 964.
- [9] Mould, D. L., Synge, R. L. M.; **J. Biochem.**, 58 (1954) 571.
- [10] Pretorius, V., Hopokins, B.J. and Schieke, J. D.; **J. Chromatogr.**, 99 (1974) 23.
- [11] Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D.; **J. Chromatogr.**, 218 (1981) 209.
- [12] Tsuda, T., Nomura, K. I.; Nakagawa, G.; **J. Chromatogr.**, 248 (1982) 241.
- [13] Knox, J. H. and Grant, I. H.; **Chromatographia**, 24 (1987) 135.
- [14] Knox, J. H. and Grant, I. H.; **Chromatographia**, 32 (1991) 317.
- [15] Tavares, M. F. M., **Quim. Nova**, 19 (1996) 173.
- [16] Schwer, C. and Kenndler, E.; **Chromatographia**, 30 (1990) 546.
- [17] Hayes, M. A.; and Ewing, A. G.; **Anal. Chem.**, 64 (1992) 512.
- [18] Chang, H. T.; Yeung, Edward, S.; **Electrophoresis**, 16 (1995) 2069.
- [19] Li, S. F. Y.; **Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications**, Journal of Chromatography Library, Elsevier Science B. V.: Amsterdam, 1992, vol. 52.
- [20] Pursch, M.; Sander, L. C.; **J. Chromatogr. A**, 887 (2000) 313.
- [21] Dorsey, J. G.; **J. Microchem.** 61 (1999) 6.
- [22] Segato, M. P.; Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; **Quim. Nova**, 32 (2009) 431.
- [23] Colón, L. A.; Maloney, T. D.; Anspach, J.; Colón, H.; **Adv. Chromatogr.** 42 (2003) 43.
- [24] Maloney, T. D.; Colón, L. A.; **J. Sep. Sci.**, 25 (2002) 1215.
- [25] Chen, C. J.; Chang, C. H.; Her, G. R.; **J. Chromatogr. A**, 1159 (2007) 22.
- [26] Oguri, S.; Oga, C.; Takeda, H.; **J. Chromatogr. A**, 1157 (2007) 304.
- [27] Huang, T.; Mi, J. Q.; Zhang, X. X.; **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) 277.
- [28] Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; **J. Sep. Sci.**, 27 (2004) 1285.
- [29] Liu, Z.; Zou, H.; Ni, J. Y.; Zhang, Y.; **Anal. Chim. Acta.**, 378 (1999) 73.
- [30] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Tanaka, N.; **Colloids Surf. A**, 187 (2001) 273.

- [31] Rouquérol, J.; Avnir, D.; Fairbridge, C. W.; Everett, D. H.; Haynes, J. H.; Pericone, N.; Ramsay, J. D. F.; Sing, K. S. W.; Unger, K. K.; **Pure Appl. Chem.**, 66 (1994) 1739.
- [32] Faria, A. M.; Bottoli, C.B.G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins C.H. **Quim. Nova**, 29 (2006) 300.
- [33] Gusev, I.; Huang, X.; Horváth, C.; **J. Chromatogr. A**, 855 (1999) 273.
- [34] Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; **Anal. Chem.**, 64 (1992) 820.
- [35] Minakushi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N.; **Anal. Chem.**, 68 (1996) 3498.
- [36] Svec, F.; **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 841 (2006) 52.
- [37] Bedair, M.; El Rassi, Z. J.; **J. Chromatogr. A**, 1044 (2004) 177.
- [38] Huclová, J.; Satínský, D.; Karlíček, R.; **Anal. Chem. Acta**, 494 (2003) 133.
- [39] Svec, F.; **J. Sep. Sci.**, 28 (2005) 729.
- [40] Eeltink S; Rozing GP; Schoenmakers PJ; Kok, W.Th.; **J. Chromatogr. A**, 1109 (2006) 74.
- [41] Augustin, V.; Jardy, A.; Gareil, P.; Hennion M.-C.; **J. Chromatogr. A**, 1119 (2006) 80.
- [42] Hilder, E. F., Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; **J. Chromatogr. A**, 1044 (2004) 3.
- [43] Hoegger, D.; Freitag, R.; **J. Chromatogr. A**, 1004 (2003) 195.
- [44] Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; **J. Chromatogr. A**, 965 (2002) 35.
- [45] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Tanaka, N.; **Colloid. Surfaces A: Physicochemical. Eng Aspects**, 187-188 (2001) 273.
- [46] Allen, D.; El Rassi, Z.; **Electrophoresis**, 24 (2003) 3962.
- [47] Ueki, Y.; Umemura, T.; Iwashita, Y.; Odake, T.; Haraguchi, H.; Tsunoda, K.; **J. Chromatogr. A**, 1106 (2006) 106.
- [48] Plieva, F. M.; Andersson, J.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B.; **J. Sep. Sci.**, 27 (2004) 828.
- [49] Hoegger, D.; Freitag, R.; **J. Chromatogr. A**, 914 (2001) 211.
- [50] Premstaller, A.; Oberacher, H.; Walcher, W.; Timperio, A. M.; Zolla, L.; Chervet, J. P.; Cavusoglu, N.; Van Dorsselaer, A.; Huber, C. G.; **Anal. Chem.**, 73 (2001) 2390.
- [51] Gusev, I.; Huang, X.; Horváth, C.; **J. Chromatogr. A**, 855 (1999) 273.
- [52] Oberacher, H.; Premstaller,; Huber, C. G.; **J. Chromatogr. A**, 1030 (2004) 201.
- [53] Quigley, C. L.; Marlin, N.; Smith, N. W.; **J. Chromatogr. A**, 1030 (2004) 195.
- [54] Buszewski, B.; Szumski, M.; **Chromatographia**, 60 (2004) s261.
- [55] Jiang, T.; Jiskra, J.; Claessens, H. A.; **J. Chromatogr. A**, 923 (2001) 215.
- [56] Preinerstorfer, B.; Bicker, W.; Lindner, W.; lämmerhofer, M.; **J. Chromatogr. A**, 1044 (2004) 187.

- [57] Fu, H.; Xie, C.; Xiao, H.; Dong, J.; Hu, Ju.; Zou, H.; **J. Chromatogr. A**, 1044 (2004) 237.
- [58] Fu, H.; Xie, C.; Dong, J.; Huang, X.; Zou, H.; **Anal. Chem.**, 76 (2004) 4866.
- [59] Yan, L.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Feng, Y.; Zhang, L.; Li, T.; Zhang, Y.; **Electrophoresis**, 26 (2005) 2935.
- [60] Bergna, H.E.; Roberts, W.O.; Colloidal Silica: Fundamentals and Applications. CRC Press: Boca Raton, 2006.
- [61] Hench, L.L.; West, J.K.; **Chem. Rev.**, 90 (1990) 33.
- [62] Schubert, U.; Hüsing, N.; Synthesis of Inorganic Materials. Wiley: Weinheim, 2005.
- [63] Mehrotra, R.C.; **J. Non-Cryst. Solids**, 121 (1990) 1.
- [64] Sanchez, J., Rankin, S. E., McCormick, A. V.; **Ind. Eng. Chem. Res.**, 35 (1996) 117.
- [65] Sharp, K.G.; **J. Sol Gel Sci. Technol.**, 35 (1996) 35.
- [66] Yoda, S., Ohshima, S., Kamiya, K., Kawai, A., Uchida, K. Gotoh, A., Ikazaki, F.; **J. Non-Cryst. Solids**, 208 (1996) 191.
- [67] Pavan, F.A., Gobbi, S.A., Moro, C.C., Costa, T.M., Benvenuti, E.V.; **J. Porous Mater.**, 9 (2002) 307.
- [68] He, L., Powers, K., Baney, R.H., Gower, L., Duran, Sheth, R.S. P., Carino, S.R.; **J. Non-Cryst. Solids**, 289 (2001) 97.
- [69] Kato, M., Dulay, M.T., Bennett, B.D., Quirino, J.P., Zare, R.N.; **J. Chromatogr. A**, 924 (2001) 187.
- [70] Dulay, M.T., Quirino, J.P., Bennett, B.D., Kato, M., Zare, R.N.; **Anal. Chem.**, 73 (2001) 3921.
- [71] Kato, M., Sakai-Kato, K., Toyo'oka, T. Dulay, M.T., Quirino, J.P., Bennett, B.D., Zare, R.N.; **J. Chromatogr. A**, 961 (2002) 45.
- [72] Li, W.; Fries, P. D.; Malik, A.; **J. Chromatogr. A**, 1044 (2004) 23.
- [73] Arakaki, L. N. H.; Airoidi, C.; **Quim. Nova**, 22 (1999) 246.
- [74] Chen, Z.; Ozawa, H.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; **Electrophoresis** 24 (2003) 2550.
- [75] Hsieh, M.-L.; Chau, G.-Y.; Hon, Y.S.; **J. Sep. Sci.**, 31 (2008) 1819.
- [76] Chen, Z.; Hobo, T.; **Electrophoresis** 22 (2001) 3339
- [77] Hayes, J.D.; Malik, A.; **Anal. Chem.**, 73 (2001) 987.
- [78] Allen, D.; El Rassi, Z.; **J. Chromatogr. A**, 1029 (2004) 239.
- [79] Fujimoto, C.; **J. High Resolut. Chromatogr.**, 23 (2000) 89.
- [80] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Hosoya, K.; Tanaka, N.; **Anal. Chem.**, 72 (2000) 1275.
- [81] Tanaka, N.; Nagayama, H.; Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; **J. High Resolut. Chromatogr.**, 23 (2000) 111.
- [82] Allen, D.; El Rassi, Z.; **Analyst**, 128 (2003) 1249.
- [83] Chen, Z.; Nishiyama, T.; Uchiyama, K.; Hobo, T.; **Anal. Chim. Acta**, 501 (2004) 17.

- [84] Ueki, Y.; Umemura, T.; Iwashita, Y.; Odake, T.; Haraguchi, H.; Tsunoda, K.; **J. Chromatogr. A**, 1106 (2006) 106.
- [85] Lin, J.; Wu, X.; Lin, X.; Xie, Z.; **J. Chromatogr. A**, 1169 (2007) 220.
- [86] Karenga, S.; Rassi, Z. El; **J. Sep. Sci.**, 31 (2008) 2677.
- [87] Huang, H.-Y.; Cheng, Y.-J.; Lin, C.-L.; **Talanta**, 82 (2010) 1426.
- [88] Chen, Z.; Cai, Y.; Cheng, J.; Zhang, L.; **J. Chromatogr. B**, 878 (2010) 2375.
- [89] Karenga, S.; El Rassi, Z.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 3200.
- [90] Huang, H.-Y.; Cheng, Y.-J.; Liu, W.-L.; Hsu, Y.-F.; Lee, S.; **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 5839.
- [91] Lin, J.; Lin, J.; Lin, X.; Wu, X.; Xie, Z.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 1674.
- [92] Wu, W.; Wu, Y.; Zheng, M.; Yang, L.; Wu, X.; Lin, X.; Xie, Z.; **Analyst**, 135 (2010) 2150.
- [93] Wu, Y.; Lin, J.; Wu, Q.; Wu, X.; Lin, X.; Xie, Z.; **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 53 (2010) 1324.
- [94] Wang, X.; Ding, K.; Yang, C.; Lin, X.; Lu, H.; Wu, X.; Xie, Z.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 2997.
- [95] Qu, Q.; Liu, D.; Mangelings, D.; Yang, C.; Hu, X.; **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 6588.
- [96] Chen, J.-L.; Lin, Y.-C.; **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 4328.
- [97] Zhu, G.; Zhang, L.; Yuan, M.; Liang, Z.; Zhang, W.; Zhang, Y.; **J. Sep. Sci.**, 30 (2007) 792.
- [98] Eeltink, S.; Svec, F.; **Electrophoresis**, 28 (2007) 137.
- [99] Ou, J.; Dong, J.; Dong, X.; Yu, Z.; Ye, M.; Zou, H.; **Electrophoresis**, 28 (2007) 148.
- [100] Huang, X.; Wang, J.; Liu, X.; **Anal. Sci.**, 18 (2002) 69.
- [101] Silva, C. R.; Jardim, I. C.S.F.; Airoidi, C.; **J. Chromatogr. A**, 913 (2001) 65.
- [102] Liu, X.; Bordunov, A.; Tracy, M.; Slingsby, R.; Avdalovic, N.; Pohl, C.; **J. Chromatogr. A**, 1119 (2006) 120.
- [103] Silva, C. R **Novos Agentes Sililantes e suas Aplicações na Modificação da Sílica Gel Cromatográfica** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química (2002).
- [104] Silva, C. R.; Airoidi, C.; Collins, E. K.; Collins, H. C.; **J. Chromatogr. A**, 1087 (2005) 29.
- [105] Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Airoidi, C.; **Quim. Nova**, 27 (2004) 270.
- [106] Silva, C. R.; Jardim, I. C.S.F.; Airoidi, C.; **J. Chromatogr. A**, 987 (2003) 139.
- [107] Silva, C. R.; Jardim, I. C.S.F.; Airoidi, C.; **J. Chromatogr. A**, 987 (2003) 127.
- [108] Progent, F.; Taverna, M.; **J. Chromatogr. A**, 1052 (2004) 181.
- [109] Ye, F.; Huang, B.; Wang, S.; Zhao, S.; **J. Sep. Sci.**, 33 (2010) 3386.
- [110] Ding, G.; Zhang, J.; Bao, J. J.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 1983.
- [111] Xie, C.; Hu, J.; Xiao, H.; Su, X.; Dong, J.; Tain, R.; He, Z.; Zou, H.; **Electrophoresis**, 26 (2005) 790.

- [112] Krenkova, J.; Lacher, N. A.; Svec, F.; **Anal. Chem.**, 82 (2010) 8335.
- [113] Wang, X., Ding, K., Yang, Ch., Lin, X., Lu, H., Wu, X., Xie, Z.; **Electrophoresis**, 31, (2010) 2997.
- [114] Stege, P. W.; Sombra, L. L.; Messina, G.; Martinez, L. D.; Silva, M. F.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 2242.
- [115] Chen, J.-L.; Lu, T.-L.; Lin, Y.-C.; **Electrophoresis**, 31 (2010) 3217.
- [116] Zhang, X.; Lin, X.; Chen, Z.; Wang, X.; Wu, X.; Xie, Z.; **J. Sep. Sci.**, 33 (2010) 3184.
- [117] Breadmore, C. M.; Shrinivasan, S.; Wolfe, A. K.; Power, E. M.; Ferrance, P. J.; Hosticka, B.; Norris, M. P.; Landers, P. J.; **Electrophoresis**, 23 (2002) 3487.
- [118] Breadmore, C. M.; Shrinivasan, S.; Karlinsey, J.; Ferrance, P. J.; Hosticka, B.; Norris, M. P.; Landers, P. J.; **Electrophoresis**, 24 (2003) 1261.
- [119] Yan, L., Zhang, Q.; Zhang, J.; Zhang, L.; Li, T.; Feng, Y.; Zhang, L.; Zhang, W.; Zhang, Y.; **J. Chromatogr. A**, 1046 (2004) 255.
- [120] Hilder, E.; Zemmann, A.; Macka, M.; Haddad, P.; **Electrophoresis**, 22 (2001) 1273.
- [121] Tang, Q.; Lee, M.; **J. Chromatogr. A**, 887 (2000) 265.
- [122] Hutchinson, J.; Hilder, E.; Macka, M.; Avdalovic, N.; Haddad, P.; **J. Chromatogr. A**, 1109 (2006) 10.
- [123] Ríordáin, Ó.; Barron, L.; Nesterenko, E.; Nesterenko P.; Paull, B.; **J. Chromatogr. A**, 1109 (2006) 111.
- [124] Huang, G.; Zeng, W.; Lin, X.; Xie, Z.; **J. Sep. Sci.**, 33 (2010) 1625.
- [125] Kubáň, P.; Kubáň, P.; Kubáň, V.; Hauser, C. P.; Boček, P.; **J. Chromatogr. A**, 1190 (2008) 377.
- [126] Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L.; **Anal. Chem.**, 70 (1998) 4339.
- [127] Tanaka, N.; Motokawa, M.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Jinnai H.; **J. Chromatogr. A**, 961 (2002) 53.
- [128] Perkin Elmer; **User's Manual. Elemental Analysis**, Norwalk: Perkin Elmer (1996).
- [129] Zhang, H.; Liu, F.; Fu, L.; Wang, J.; Liu, Z.; Li, H.; **Thin Solid Films.**, 419 (2002) 178.
- [130] Fonseca, F. N.; **Técnicas Modernas de Separação e Análise de Extratos Vegetais** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química (2002).
- [131] Legido-Quigley, C.; Marlin, N. D.; Melin, V.; Manz, A.; Smith, N. W.; **Electrophoresis**, 24 (2003) 917.
- [132] Kłodzińska, E.; Moravcova, D.; Jandera, P.; Buszewski, B.; **J. Chromatogr. A**, 1109 (2006) 51.
- [133] Neue, U.D.; **HPLC Columns, Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.

## Referências

- [134] Berendsen, G. E., Pikaart, K. A., de Galan, L.; **J. Liq. Chromatogr.**, 3 (1980) 1437.
- [135] Mai, T. D.; Pham, H. V.; Hauser, P. C.; **Anal. Chim. Acta**, 653 (2009) 228.
- [136] Tanyanyiwa, J.; Schweizer, K.; Hauser, P.; **Electrophoresis** 24 (2003) 2119.
- [137] Coufal, P.; Zuska, J.; Van, T.; Smith, V.; Gaš, B.; **Electrophoresis** 24 (2003) 671.