

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

VALESKA SOARES AGUIAR

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS À BASE DE OCTADECILMETACRILATO PARA USO EM ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. CARLA BEATRIZ GRESPAN BOTTOLI

ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CARLA BEATRIZ GRESPAN BOTTOLI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Ag93dAguiar, Valeska Soares (1987-).
Desenvolvimento e caracterização de fases
estacionárias monolíticas à base de octadecilmetacrilato
para uso em eletrocromatografia capilar / Valeska Soares
Aguiar. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.Orientador: Carla Beatriz Grespan Bottoli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.1. Eletrocromatografia capilar. 2. Fases estacionárias
monolíticas. 3. Octadecilmetacrilato. I. Bottoli, Carla
Beatriz Grespan. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and characterization of octadecyl methacrylate-based monolithic stationary phases for use in capillary electrochromatography

Palavras-chave em inglês:

Capillary electrochromatography Monolithic stationary phases Octadecyl methacrylate

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Carla Beatriz Grespan Bottoli [Orientador] Dosil Pereira de Jesus Marina Franco Maggi Tavares

Data de defesa: 15/12/2011

Programa de pós-graduação: Química

É quando resistes que conhece o que te move. E, para a folha entregue ao vento, deixa de haver vento, da mesma maneira que para a pedra liberta deixa de haver peso.

(Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico esta dissertação aos meus pais, Maria Carlota e Airton, pela paciência que tiveram comigo e pelo carinho que me deram não só nestes sete anos em que morei em Campinas, mas em cada um dos meus 24 anos de vida. São eles os responsáveis pela consciência que desenvolvi sobre o quão importante é estudar. São eles os meus maiores incentivadores e, sem eles, talvez eu não tivesse o apoio de que precisava para continuar fora de minha querida terra natal, Sorocaba, e seguir meus estudos.

Dedico, também, à minha irmã e melhor amiga, Viviane, que me apoiou incondicionalmente e colaborou para que este texto saísse o mais perfeito possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, à professora Carla pela excelente orientação e pelo exemplo como professora e pessoa, disposta a receber seus alunos com simpatia e educação a qualquer momento. Obrigada por ter me apresentado à Cromatografia logo no início da graduação, em meados de 2006, e ter feito com que eu me apaixonasse por essa fascinante área da Química Analítica. Obrigada pela amizade que construímos desde a época de Iniciação Científica, em 2007. Obrigada pela oportunidade que me deu em iniciar este projeto e pela dedicação com que o conduziu até se tornar mestrado. Obrigada por tudo, professora Carla. Sempre a terei como inspiração para tentar me tornar uma professora assim, tão especial.

À professora Bel Jardim pela atenção que sempre me deu e pelo carinho com que me tratou. Admiro-lhe como pessoa e professora. Muito obrigada pela contribuição dada à minha dissertação.

À professora Carol Collins pelo interesse em ler os textos relacionados a este trabalho e por incrementá-los com suas boas ideias. Sua esmerada dedicação ao ensino serve, para mim, como um precioso exemplo do que é ser professora.

À María de Jesús ou, simplesmente, Mare, uma grande amiga que fiz durante minha jornada no laboratório A2-103. Obrigada por, desde a Iniciação Científica, ter contribuído com a parte experimental de meu trabalho – você também foi minha orientadora. Obrigada por ter sido sempre minha amiga. E, espero, sinceramente, que logo nos encontremos, seja no Brasil ou no México.

Aos meus amigos do laboratório, responsáveis por uma alegre convivência: Walkyria, Bruna, Adriana, Aline, Gisláine, Hugo, Mariana, Marcelo, Fernanda, Raquel, Alex, China, Soraia, Gaby, Karina, Sandra, Carlos, Stanis, Elias, Milena, Dani, Carla, Karen e Liane. À Lucília, sem a qual teria sido muito mais difícil conduzir este trabalho. Muito obrigada pela amizade, pela ajuda e pelo exemplo de trabalho e dedicação ao laboratório.

Aos técnicos e funcionários do Instituto de Química e, em especial, aos que colaboraram diretamente para o meu trabalho: Daniel, por todas as microscopias, e Márcia e Priscila, pela ajuda em minha busca pela melhor interpretação possível dos resultados porosimétricos. Aos funcionários da Coordenadoria de Pós-Graduação, Bel, Gabriela e Miguel, pela paciência em resolver minhas dúvidas sobre o mestrado.

Aos meus pais, Maria Carlota e Airton, e à minha irmã, Viviane, pelo apoio que me deram durante a realização desta dissertação. Pela paciência e pelo amor. Sem vocês, minha caminhada teria sido mais árdua.

Ao Anderson, que me acompanhou com amor e carinho por mais de cinco anos. A graduação não foi fácil, mas ele teve paciência para que eu continuasse estudando e concluísse o tão sonhado mestrado.

Às minhas amigas de Sorocaba e Campinas – Liane, Raquel, Michele, Fabiana, Tati, Bruna e Chris –, sem as quais esses anos fora de casa teriam sido mais difíceis.

Ao CNPq e ao INCTBioanalítica pelo apoio financeiro ao projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida a mim.

E à UNICAMP pela oportunidade que me deu para desenvolver este projeto.

Muito obrigada.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Valeska Soares Aguiar Nome em citações bibliográficas: Aguiar, V. S. Endereço eletrônico: valeska.saguiar@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel e licenciada em Química

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Período: 03/2005 a 12/2009

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Iniciação Científica

• Projeto: "Avaliação de monolitos do tipo C18 para uso em eletrocromatografia capilar".

Instituição financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (Instituto de Química-UNICAMP)

Período: 12/2007 a 11/2009

Participação em Congressos

 Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Desenvolvimento e caracterização de fases estacionárias monolíticas poliméricas do tipo C18 para uso em eletrocromatografia capilar", (2011) 16º Encontro Nacional de Química Analítica – Campos do Jordão (SP) – Brasil.

 Aguiar, V. S.; Gama, M. R.; Bottoli, C. B. G. "Estudo da homogeneidade do leito cromatográfico de colunas capilares monolíticas baseadas em polímeros", (2011) 16º Encontro Nacional de Química Analítica – Campos do Jordão (SP) – Brasil. Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Desenvolvimento e avaliação de colunas monolíticas poliméricas de metacrilato para uso em eletrocromatografia capilar", (2011) 2º Congresso Analitica Latin America – São Paulo (SP) – Brasil.

• Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Preparação e caracterização de colunas monolíticas poliméricas de caráter hidrofóbico para CEC", (2010) 4º Simpósio de Cromatografia e Técnicas Afins – Campos do Jordão (SP) – Brasil.

 Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Colunas monolíticas poliméricas preparadas a partir de octadecilmetacrilato: caracterização física e eletroforética", (2010) 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindoia (SP) – Brasil.

 Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Avaliação de monolitos do tipo C18 para uso em eletrocromatografia capilar", (2009) XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

• Aguiar, V. S.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G. "A study of the porogenic solvents in the synthesis of methacrylate-based monolithic columns for capillary electrochromatography", (2008) 14^o Simposio Latinoamericano en Aplicaciones de la Electroforesis Capilar y Tecnología del Microchip en Biotecnología, Biomedicina, Biofarmacia e Industria – Puerto Vallarta – México.

• Aguiar, V. S.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G. "Desenvolvimento de metodologia para determinação de parabenos em adoçantes por eletrocromatografia capilar", (2008) XII Congresso Latino-americano de Cromatografia e Técnicas Afins – Florianópolis (SC) – Brasil.

 Aguiar, V. S.; Bottoli, C. B. G. "Avaliação de monolitos do tipo C18 para uso em eletrocromatografia capilar", (2008) XVI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

Aguiar, V. S.; Marangoni, F.; Silva, C. C.; Silva, J. A. F.; Bottoli, C. B. G.
 "Caracterização de extratos de *Piper methysticum* por meio de cromatografia eletrocinética micelar em fluxo reverso", (2007) 14º Encontro Nacional de Química Analítica – João Pessoa (PB) – Brasil.

xii

Artigos científicos

• Aguiar, V. S.; Gutiérrez-Ponce, M. J. S.; Aquino, W. M.; Bottoli, C. B. G. Determination of parabens in sweetners by capillary electrochromatography. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Artigo aceito em 06/2011.

Formação complementar

 "Fundamentos e aplicações analíticas da espectrometria de massas".
 Professor responsável: Fábio Cesar Gozzo (IQ-UNICAMP); (2011) 16º Encontro Nacional de Química Analítica – Campos do Jordão (SP) – Brasil.

 "Road show de consumíveis 2011 – LC, GC e SPE". Professores responsáveis: Celso Blatt (Agilent Brasil) e Brian Smith (Agilent Canadá); (2011)
 Faculdade de Engenharia de Alimentos – Campinas (SP) – Brasil.

"Fundamentos de UV-Vis". Professora responsável: Ivani Blanco (Agilent);
 (2010) Agilent Technologies – Barueri (SP) – Brasil.

• "Química Forense". Professor responsável: Valter Stefani (IQ-UFRGS); (2009) Instituto de Química da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

"Experimentação em química nos Ensinos Fundamental, Médio e Superior".
 Professores responsáveis: José de Alencar Simoni e Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP); (2009) Instituto de Química da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

• "Educação em química". Professora responsável: Maria Inês Freitas Petrucci dos Santos Rosa (FE-UNICAMP); (2008) Instituto de Química da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

 "Novidades e perspectivas em materiais poliméricos". Professor responsável: Fernando Galembeck (IQ-UNICAMP); (2008) Instituto de Química da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

• "Enzimas: catalisadores naturais em síntese orgânica". Professores responsáveis: Álvaro Takeo Omori (CCNH-UFABC) e Leandro Helgueira de Andrade (IQ-USP); (2008) Instituto de Química da USP – São Paulo (SP) – Brasil.

xiii

Experiência docente

• Participação no Programa de Estágio Docente (PED), no grupo C – 1º semestre de 2011

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Disciplina: Química III (Química Analítica para Engenharia Química)

Professora responsável: Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno.

• Participação no Programa de Estágio Docente (PED), no grupo C – 2° semestre de 2010

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Disciplina: Química Clássica (Química Analítica para Farmácia)

Professor responsável: Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Junior.

Premiações

Prêmio Lavoisier – Melhor aluno do curso de Bacharelado em Química do período 2005-2009 da UNICAMP; (2010) Conselho Regional de Química – IV Região – Campinas (SP) – Brasil.

 Menção Honrosa pela apresentação do trabalho "Avaliação de monolitos do tipo C18 para uso em eletrocromatografia capilar" junto ao XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP; (2009) Pró-reitoria de Pesquisa da UNICAMP – Campinas (SP) – Brasil.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS À BASE DE OCTADECILMETACRILATO PARA USO EM ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR. A Eletrocromatografia Capilar (CEC) é uma técnica de separação que combina a seletividade cromatográfica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com a alta eficiência da Eletroforese Capilar (CE). A coluna capilar usada na separação é preenchida com uma fase estacionária, que pode ser do tipo particulada ou monolítica. Neste trabalho, monolitos poliméricos orgânicos foram preparados por polimerização in situ a partir dos monômeros octadecilmetacrilato (precursor e seletor hidrofóbico), etilenodimetacrilato (agente de entrecruzamento) e ácido 2-acriloilamido-2metilpropanossulfóxido (monômero ionizável), além de diferentes tipos de solventes porogênicos, como álcool isoamílico, amílico, cicloexanol e 1,4butanodiol, na presença e na ausência de água. Na primeira etapa do trabalho, variaram-se a natureza e a proporção entre os solventes porogênicos e, na segunda, o mesmo ocorreu com a proporção entre o conjunto de monômeros e de solventes porogênicos. As fases estacionárias foram caracterizadas por técnicas físicas como a microscopia eletrônica de varredura e a porosimetria; e as colunas moldadas com o material monolítico foram avaliadas pela técnica de CEC. As colunas apresentaram eficiência na faixa de 3000 a 50000 pratos m⁻¹. A análise das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio e das curvas de distribuição de poros permitiu afirmar que o material monolítico sintetizado é essencialmente micro e mesoporoso. Os macroporos para fluxo de fase móvel foram nitidamente observados em imagens de microscopia eletrônica de varredura. Assim, as fases monolíticas apresentaram três tipos de poros: micro, meso e macroporos. Na segunda parte do trabalho, avaliou-se a repetibilidade de preparo das fases monolíticas e notou-se grande falta de repetibilidade em termos de eficiência de separação. As fases monolíticas apresentaram alto caráter apolar e seletividade metilênica adequada para separação de analitos apolares e aromáticos, como alguilbenzenos, alguilparabenos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

X٧

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF OCTADECYL METHACRYLATE-BASED MONOLITHIC STATIONARY PHASES FOR USE IN CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY. Capillary Electrochromatography (CEC) is a separation technique that matches the chromatographic selectivity of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with the high efficiency of Capillary Electrophoresis (CE). The capillary column used in the separation is filled with a stationary phase, which can be particulate or monolithic. In this work, organic polymeric monoliths were prepared through *in situ* polymerization from the monomers octadecyl methacrylate (precursor and hydrophobic selector), ethylene dimethacrylate (cross-linking agent) and 2-acryloylamido-2-methylpropanesulfonic acid (ionizable component), using different types of porogenic solvents, such as isoamyl alcohol, amyl alcohol, cyclohexanol and 1,4-butanediol, in the presence or absence of water. In the first step, the nature and proportion between the porogenic solvents were varied and, in the second, the same occurred with the proportion between the set of monomers and porogenic solvents. The stationary phases were characterized by physical techniques such as scanning electron microscopy and porosimetry; and the columns prepared with the monolithic material were evaluated through the CEC technique. The columns presented efficiencies in the range of 3000 to 50000 plates m⁻¹. Analysis of the nitrogen adsorption and desorption isotherms and the pore distribution curves enable affirming that the synthesized monolithic material is essentially micro- and mesoporous. The macropores for the flow of the mobile phase were clearly observed in images of scanning electron microscopy. So, the monolithic phases have three types of pores: micro-, meso- and macropores. In the second part of this work, the repeatability of synthesis of the monolithic phases was evaluated and a lack of repeatability related to separation efficiency was noted. The monolithic phases had high apolar character and adequate methylenic selectivity for separation of apolar and aromatic analytes, such as alkylbenzenes, alkylparabens and polycyclic aromatic hydrocarbons.

xvii

ÍNDICE GERAL

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS xxi
LISTA DE TABELAS xxiii
LISTA DE FIGURAS
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. A eletrocromatografia capilar 1
1.2. Parâmetros cromatográficos em CEC 6
1.3. Tipos de fases estacionárias em CEC 13
1.3.1. Colunas recheadas com partículas 13
1.3.2. Colunas tubulares abertas com parede recoberta 16
1.3.3. Colunas moldadas com material monolítico 18
1.4. Caracterização da estrutura porosa de sólidos 29
1.4.1. Caracterização da estrutura porosa de materiais monolíticos 35
1.5. Revisão bibliográfica 38
2. OBJETIVOS
3. PARTE EXPERIMENTAL
3.1. Materiais e reagentes 51
3.2. Equipamentos
3.3. Pré-tratamento do capilar 52
3.4. Polimerização dos monolitos 52
3.5. Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura 55
3.6. Porosimetria 56
3.7. Análise elementar 57
3.8. Preparo do eletrólito de corrida e amostras 57
3.9. Condicionamento e avaliação eletroforética dos capilares 59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO
4.1. Colunas preparadas variando-se o tipo e a proporção de solventes
porogênicos 61
4.1.1. Caracterização eletroforética 61
4.1.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias

4.1.2. Caracterização físico-química	71
4.1.2.1. Porosimetria	71
4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura	85
4.1.3. Separação de alquilparabenos	92
4.1.4. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH)	93
4.2. Colunas preparadas variando-se a proporção entre monômeros e solve	entes
porogênicos	96
4.2.1. Caracterização eletroforética	96
4.2.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias	. 101
4.2.2. Caracterização físico-química	. 102
4.2.2.1. Porosimetria	102
4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura	113
4.2.2.3. Análise elementar	. 117
4.2.3. Estudo de repetibilidade de síntese das fases estacionárias	. 118
4.2.3.1. Fases estacionárias de diferentes composições poliméricas	118
4.2.3.1.1. Caracterização eletroforética	119
4.2.3.1.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias	. 129
4.2.3.1.2. Caracterização físico-química	. 131
4.2.3.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura	131
4.2.3.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura ao longo do	leito
cromatográfico	136
4.2.3.2. Fases estacionárias de mesma composição polimérica	. 142
4.2.3.2.1. Caracterização eletroforética	. 143
4.2.3.2.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias	. 150
4.2.3.2.2. Caracterização físico-química	. 152
4.2.3.2.2.1. Porosimetria	152
4.2.3.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura	159
4.2.4. Separação de <i>o</i> -terfenil, pentilbenzeno e trifenileno	. 164
4.2.5. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH)	165
5. CONCLUSÕES	. 169
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	. 171
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A Constante da equação de van Deemter relacionada aos caminhos múltiplos
- AIBN Azobisisobutironitrila
- AMPS Ácido 2-acriloilamido-2-metilpropanossulfóxido
- B Constante da equação de van Deemter relacionada à difusão longitudinal
- BET Brunauer, Emmett e Teller
- BDDT Brunauer, Deming, Deming e Teller
- BJH Barret, Joyner e Hallenda
- C Constante da equação de van Deemter relacionada à transferência de massa
- CE Eletroforese capilar
- CEC Eletrocromatografia capilar
- DMF N,N-dimetilformamida
- DSC Calorimetria diferencial de varredura
- DV Divinilbenzeno
- E Campo elétrico
- EDMA Etilenodimetacrilato
- EOF Fluxo eletrosmótico
- GC Cromatografia gasosa
- GMA Glicidilmetacrilato
- H Altura equivalente a um prato
- HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência
- k Fator de retenção para HPLC e, para CEC, quando se tem analitos neutros
- k* Fator de retenção para CEC
- Lef Comprimento da coluna capilar da extremidade inicial até a região da janela

de detecção

- LC Cromatografia líquida
- MEKC Cromatografia eletrocinética micelar
- META Cloreto de 2-(metacriloiloxietil-trimetilamônio)
- Mes Ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado
- MIP Porosimetria por intrusão de mercúrio

- **MS** Espectrometria de massas
- N Número de pratos
- NMR Ressonância magnética nuclear
- **ODMA** Octadecilmetacrillato
- **ODS** Partículas com octadecilsilicato
- PAH Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- pCEC Eletrocromatografia capilar assistida por pressão
- PCL ε-caprolactona
- RPLC Cromatografia líquida no modo fase reversa
- RSD Estimativa do desvio padrão relativo
- $\mathbf{S}-\mathsf{Estireno}$
- SEM Microscopia eletrônica de varredura
- teo Tempo de migração do marcador de fluxo eletrosmótico
- THF Tetrahidrofurano
- TLC Cromatografia em camada delgada
- t_m Tempo de migração
- TMSPM 3-(trimetóxisilil)propilmetacrilato
- Tris 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
- UV Ultravioleta
- UV-Vis Ultravioleta-visível
- veo Velocidade de fluxo eletrosmótico
- w_B Largura da base do pico
- w_h Largura do pico a meia altura
- α Seletividade metilênica ou hidrofóbica
- ε_r Constante dielétrica da fase móvel
- η Viscosidade da fase móvel
- ζ Potencial zeta
- δ Espessura da dupla camada elétrica
- μ_{eo} Mobilidade do fluxo eletrosmótico
- μ_{ep} Mobilidade eletroforética

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos e proporções de solventes porogênicos avaliados no preparo dos
monolitos
Tabela 2. Proporções de monômeros:porogênicos avaliados na polimerização dos
monolitos
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se o tipo
e a proporção dos solventes porogênicos 62
Tabela 4. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se o tipo e
a proporção dos solventes porogênicos 63
Tabela 5. Seletividade metilênica das colunas preparadas variando-se o tipo e a
proporção dos solventes porogênicos 70
Tabela 6. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico em que
se variaram o tipo e a proporção dos solventes porogênicos
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se a
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos
Tabela 8. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se a
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos
Tabela9.Seletividademetilênicadascolunaspreparadasvariando-sea
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos
Tabela 10. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico em que
se variou a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos 102
Tabela 11. Parâmetros de análise elementar para as amostras de material
monolítico em que se variou a proporção entre os monômeros e os solventes
porogênicos
Tabela 12. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se a
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de
repetibilidade
Tabela 13. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se a
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de
repetibilidade 120

Tabela 14. Seletividade metilênica das colunas preparadas variando-se a
proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de
repetibilidade 130
Tabela 15. Parâmetros cromatográficos das colunas de composição H.143
Tabela 16. Parâmetros eletroforéticos das colunas de composição H. 146
Tabela 17. Seletividade metilênica das colunas de composição H. 151
Tabela 18. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico de
composição H 152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de instrumentação de CEC. 1 e 3: recipientes de fase móvel
(solução tampão); 2: capilar de sílica fundida; 4: eletrodos; 5: voltagem; 6: ponto
de detecção; 7: pressão externa 1
Figura 2. Esquema da dupla camada elétrica e representação do fluxo
eletrosmótico normal (catódico) 3
Figura 3. Perfis de fluxo de fase móvel, induzidos por potencial e por pressão e
perfil dos picos gerado por cada tipo de fluxo [adaptado de 18] 4
Figura 4. Curva de van Deemter hipotética 10
Figura 5. Os seis tipos de isotermas de adsorção segundo BET e Hill e Halsey
[adaptado de 162] 31
Figura 6. Perfis da t-curva para materiais microporosos (A), mesoporosos (B) e
não porosos (A e B) [adaptado de 180] 35
Figura 7. Representação esquemática da reação envolvendo os grupos silanoatos
da parede interna do capilar com solução de TMSPM em DMF, sob aquecimento a
100 °C
Figura 8. Representação esquemática da reação de decomposição do AIBN,
formando gás nitrogênio e radicais livres. Neste caso, sob aquecimento a 60 ºC 53
Figura 9. Representação esquemática da reação de polimerização, sob
aquecimento a 60 °C 53
Figura 10. Fórmulas estruturais dos analitos. 1. Etilbenzeno; 2. Propilbenzeno;
3. Butilbenzeno; 4. Pentilbenzeno 64
Figura 11. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 3
(1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno).
Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L ⁻¹ pH 8,0 /
acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm;
temperatura: 25 °C 64
Figura 12. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 1
(1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno).
Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L ⁻¹ pH 8,0 /

 Figura 34. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 3 (15% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de Figura 35. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 1 (25% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de Figura 36. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 2 (35% 1,4butanodiol). A esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de Figura 37. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 4 (15% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de Figura 38. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 5 (25% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 39. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 6 (35% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de Figura 40. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 7. À esquerda,

Figura 41. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 8. À esquerda, Figura 42. Fórmulas estruturais dos 4 alguilparabenos. 1. Metilparabeno: Figura 43. Eletrocromatograma da mistura de alquilparabenos no capilar 7 2. 3. (1. Tioureia: Metilparabeno: Etilparabeno: 4. Propilparabeno: 5. Butilparabeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 70:30 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; Figura 44. Fórmulas estruturais de 12 PAH. 1. Naftaleno; 2. Acenaftileno; 3. Fluoreno; 4. Acenafteno; 5. Fenantreno; 6. Antraceno; 7. Fluoranteno; 8. Pireno; 9. Criseno; 10. Benzo[a]antraceno; 11. Benzo[b]fluoranteno; 12. Benzo[a]pireno.

Figura 48. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar A (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno).

Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; Figura 49. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar D (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; Figura 50. Eletrocromatograma da mistura de alguilbenzenos no capilar E (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 100 Figura 51. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária G. 105 Figura 52. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H. 105 Figura 53. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária B. 106 Figura 54. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária C. 106 Figura 55. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária A. 107 Figura 56. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária D. 107 Figura 57. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária E. 108 Figura 58. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária F. 108 Figura 59. Curva de distribuição de poros da fase estacionária G. 109 Figura 60. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H. 110 Figura 61. Curva de distribuição de poros da fase estacionária B. 110 Figura 62. Curva de distribuição de poros da fase estacionária C. 111 Figura 63. Curva de distribuição de poros da fase estacionária A. 111 Figura 64. Curva de distribuição de poros da fase estacionária D. 112 Figura 65. Curva de distribuição de poros da fase estacionária E. 112 Figura 66. Curva de distribuição de poros da fase estacionária F. 113 Figura 67. Fotomicrografias eletrônicas de varredura das fases G, à esquerda (80% solventes porogênicos) e H, à direita (75% solventes porogênicos). Ampliação de 5000 vezes. 114

Figura 68. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B (71% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes. 114 Figura 69. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C (69% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes. 114 Figura 70. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A (67% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 71. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D (65% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes. 115 Figura 72. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E (63% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes, no meio de 20000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes. 115 Figura 73. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F (60% solventes porogênicos). A esquerda, ampliação de 1000 vezes, no meio de 20000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes. 115 Figura 74. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar G1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 121 Figura 75. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar G2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 122 Figura 76. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno).

Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 /

 Figura 88. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar F1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.

Figura 89. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar F2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno).

Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 129 Figura 90. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G1 (80% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes. 131 **Figura 91.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G2 (80% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes. 131 Figura 92. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H1 (75% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 93. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H2 (75% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 94. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B1 (71% solventes porogênicos). A esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 95. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B2 (71% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 96. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C1 (69% solventes porogênicos). A esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 97. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C2 (69% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de Figura 98. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A1 (67% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de

 Figura 105.
 Fotomicrografias
 eletrônicas
 de
 varredura
 do
 capilar
 F2

 (60% solventes porogênicos).
 À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.
 135

Figura 106.Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G1 em duasregiões diferentes do leito cromatográfico (80% solventes porogênicos,13000 pratos m⁻¹).137

Figura 109. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (75% solventes porogênicos, 50000 pratos m⁻¹). **138** Figura 110. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (71% solventes porogênicos, Figura 111. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (71% solventes porogênicos, Figura 112. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (69% solventes porogênicos, Figura 113. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (69% solventes porogênicos, 18000 pratos m⁻¹). 139 Figura 114. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (67% solventes porogênicos, Figura 115. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (67% solventes porogênicos, Figura 116. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (65% solventes porogênicos, Figura 117. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (65% solventes porogênicos, 30000 pratos m⁻¹). 140 Figura 118. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (63% solventes porogênicos, **Figura 126.** Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H8 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 /

acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 149 Figura 127. Eletrocromatograma da mistura de alguilbenzenos no capilar H9 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.0 / acetonitrila 30:70 v/v; injecão: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; deteccão: 220 nm; temperatura: 25 °C. 149 Figura 128. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H10 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C. 150 Figura 129. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H11. 154 Figura 130. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H12. 154 Figura 131. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H13. 155 Figura 132. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H14. 155 Figura 133. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H15. 156 Figura 134. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H11. 156 Figura 135. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H12. 157 Figura 136. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H13. 157 Figura 137. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H14. 158 Figura 138. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H15. 158 Figura 139. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H3 (33000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 159 Figura 140. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H4. Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de Figura 141. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H5 (19000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 160
Figura 142. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H6 (16000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 160 Figura 143. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H7 (5800 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 160 Figura 144. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H8 (10000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 160 Figura 145. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H9 (20000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 161 Figura 146. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H10 (28000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes. 161 Figura 147. Fórmulas estruturais de: 1. O-terfenil; 2. Pentilbenzeno; 3. Trifenileno.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A eletrocromatografia capilar

A eletrocromatografia capilar (CEC) pode ser definida como uma técnica de separação em meio líquido de alta eficiência, que utiliza colunas capilares preenchidas com fase estacionária e em que os analitos são separados na presença de um campo elétrico. Para muitos autores, CEC é definida como uma técnica híbrida, que combina a alta seletividade da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a alta eficiência da eletroforese capilar (CE), gerando maior velocidade de análise [1-8]. Porém, segundo Svec [9], essa definição não é completamente correta, pois há características de separação em CEC que não são comuns a nenhuma das técnicas (HPLC e CE).

A Figura 1 mostra um esquema de instrumentação usado em CEC. Os recipientes de fase móvel ficam em contato com as extremidades da coluna capilar, por meio da qual ocorrerá a separação dos componentes da mistura analisada. Os eletrodos são necessários para a aplicação de potencial no sistema gerando, assim, o fluxo eletrosmótico (EOF), que faz os compostos atravessarem a coluna e se separarem. Se, além de potencial, a pressão externa for aplicada, a técnica de separação é chamada de eletrocromatografia capilar assistida por pressão (pCEC) [10,11]. A detecção é em linha, sendo o detector mais comum aquele baseado na absorção de radiação UV pelos compostos.



Figura 1. Esquema de instrumentação de CEC. 1 e 3: recipientes de fase móvel (solução tampão); 2: capilar de sílica fundida; 4: eletrodos; 5: voltagem; 6: ponto de detecção; 7: pressão externa.

Assim como em CE, a força elétrica que impulsiona os analitos dentro da coluna capilar usada em CEC em direção ao detector é o fluxo eletrosmótico. Os primeiros trabalhos relatados na literatura sobre tal fluxo foram aplicados em cromatografia líquida (LC) por Strain e Lecoq, em 1939 e em 1944, respectivamente.

Segundo Dorsey [12], o maior mérito de uma separação por cromatografia é a capacidade de picos que uma coluna pode fornecer, ou seja, a quantidade de picos que um cromatograma pode apresentar. Essa quantidade seria maior à medida que os picos dos analitos separados fossem mais resolvidos e eficientes. Dessa forma, a separação de amostras muito complexas não era bem sucedida por LC, o que tornou necessário o desenvolvimento de bombeamento de fase móvel por EOF, um modo mais eficiente de obter uma determinada separação. Knox e Grant [13] desenvolveram seu trabalho a fim de confirmar que o bombeamento por EOF fornecia separações mais eficientes.

A aplicação de EOF para a movimentação de analitos separados por cromatografia em camada delgada (TLC) foi realizada por Mould e Synge em 1952 [14]. Mas a primeira aplicação de EOF em cromatografia de coluna data de 1974 e foi realizada por Pretorius *et al.* [15], cuja proposta era o aumento de velocidade das análises desenvolvidas por cromatografia líquida. Em seu trabalho, Pretorius *et al.* definiram a geração do EOF dentro da coluna capilar, fenômeno provocado pela presença de grupos ionizáveis na superfície interna da parede do capilar, que atrai camadas de íons de carga oposta, provenientes da solução tampão, formando uma camada fixa e uma móvel de íons, originando a dupla camada elétrica com espessura δ . Entre as camadas, há o plano de cisalhamento, cuja diferença de potencial gerada pela presença de cargas na região é o potencial zeta (ζ). Ao aplicar uma diferença de potencial e gerar um determinado campo elétrico no meio, os íons da camada móvel são atraídos pelo eletrodo de carga oposta e se movem em direção a este, carregando todos os solutos presentes em solução. Esta força elétrica que carrega todos os analitos corresponde ao fluxo

eletrosmótico, representado na Figura 2, cuja velocidade pode ser definida pela equação 1.



Figura 2. Esquema da dupla camada elétrica e representação do fluxo eletrosmótico normal (catódico).

$$v_{eo} = -\left(\frac{\varepsilon_r}{4\pi\eta}\right)E\zeta$$
 (Equação 1)

Na equação 1, v_{eo} é a velocidade do fluxo eletrosmótico, ε_r é a constante dielétrica do líquido, η é a viscosidade do líquido, E é o campo elétrico e ζ é o potencial zeta, cujo valor dependerá da polaridade do solvente componente da fase móvel [15]. Segundo análise de Jiskra *et al.* [16], a espessura da dupla camada (diretamente proporcional ao potencial zeta), a viscosidade da solução e o potencial zeta são fortemente influenciados pela natureza e carga da superfície da fase estacionária, pela composição da fase móvel e pela temperatura. Conforme pode ser observado na equação 1, a velocidade do EOF não depende do tamanho das partículas constituintes da fase estacionária que preenche o capilar em CEC. Neste caso, o EOF é gerado não só por ionização de grupos silanóis da parede interna do capilar, como também por grupos silanóis na superfície das partículas de sílica que formam a fase estacionária devido à sua elevada área superficial [3]. Segundo Smith e Carter-Finch [4], a intensidade do EOF depende também da natureza do ligante presente nas partículas de fase estacionária, se esta for do tipo particulada. Além das considerações formuladas anteriormente, as partículas constituintes da fase estacionária para CEC, segundo Barceló-Barrachina *et al.* [17], não podem sofrer o processo de capeamento como aquelas usadas em HPLC, devido à necessidade de haver grupos silanóis na superfície das mesmas para geração de EOF.

A presença do fluxo eletrosmótico é a principal vantagem da técnica de separação por CEC. O perfil de fluxo de fase móvel é planar, ao contrário do fluxo induzido por pressão, presente em HPLC, cujo perfil é parabólico, como pode ser observado na Figura 3.



Figura 3. Perfis de fluxo de fase móvel, induzidos por potencial e por pressão, e perfil dos picos gerado por cada tipo de fluxo [adaptado de 18].

O perfil planar indica que zonas do mesmo analito possuem velocidades de migração semelhantes e alcançam o detector ao mesmo tempo, havendo, portanto, uma menor dispersão da banda do analito. Se o perfil de fluxo é parabólico, ocorrido quando este é induzido por pressão, zonas do mesmo analito atingem o detector em tempos diferentes e causam uma dispersão da banda, alargando os picos presentes no cromatograma, caso seja uma separação desenvolvida por LC [1,15,19,20]. Segundo Dorsey [12], o perfil de fluxo planar em CEC é gerado entre as partículas, enquanto o fluxo induzido por pressão, em HPLC depende do espaço existente entre as partículas de fase estacionária.

A coluna capilar usada em CE e CEC é de sílica fundida revestida, geralmente, por poliimida, o que permite que não ocorra invasão de oxigênio nem de vapor da água em direção ao interior do capilar [21]. Segundo Tang e Lee [21],

o tubo de sílica fundida recoberto com poliimida apresenta alta resistência elétrica e à pressão, adequada transparência sob a luz UV (ao contrário da poliimida), alta condutividade térmica, boa inércia química e flexibilidade, além de grande resistência mecânica, antes de entrar em contato com solventes orgânicos.

O uso de capilares de reduzido diâmetro interno se deve ao objetivo de prevenir ou ao menos amenizar um dos maiores problemas enfrentados por CE: o aquecimento por efeito Joule. Quando se diminui o diâmetro interno das colunas, aumenta-se a razão entre a área superficial e o volume, dissipando de forma mais eficiente o calor gerado pela passagem de corrente no sistema e reduzindo a diferença de temperatura entre o centro do capilar e as regiões próximas à parede - o processo minimiza diferenças de velocidades entre zonas do mesmo analito e causa menor dispersão da sua banda e picos mais estreitos, ou seja, mais eficientes no eletroferograma [18,22]. O uso de solução tampão em alta concentração para compor a fase móvel também contribui com o aumento da temperatura dentro do capilar, sendo mais um fator a levar ao alargamento de bandas e à consequente baixa eficiência de separação [23]. De acordo com Wan [23], a variação de temperatura devido à alta concentração da solução tampão pode gerar um gradiente de viscosidade da fase móvel e, por consequência, criar pequenas variações no perfil do fluxo eletrosmótico. Segundo Bartle e Myers [3], para a redução do autoaquecimento do capilar é interessante o uso de tampões zwitteriônicos, como Tris (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol). De acordo com Rathore *et al.* [24], a elevação da temperatura no interior da coluna afeta o fluxo eletrosmótico e a difusão dos analitos, podendo influenciar a eficiência cromatográfica e a repetibilidade das análises. O estudo da alteração da temperatura na coluna é feito por meio do monitoramento da corrente elétrica gerada dentro do capilar conforme o potencial aplicado no sistema.

Para Simal-Gándara [2], muito mais prejudicial para a separação que o efeito Joule são as bolhas de ar que podem se formar no interior do capilar, principalmente nas regiões de transição entre seções recheadas e não recheadas. Nas colunas recheadas com partículas, essas regiões se localizam nos *frits* (filtros retentores de fase estacionária particulada [21]). Além disso, as bolhas podem ser

formadas pelo próprio aquecimento do sistema, o que causa ruído na linha de base e queda de corrente elétrica e leva à interrupção da análise [25]. Muitas vezes, para a remoção das bolhas durante a análise, aplica-se pressão, fornecendo estabilidade e repetibilidade na separação – a técnica é chamada de pCEC [7]. Entretanto, é importante lembrar que qualquer tipo de pressurização ocasiona, em longo prazo, fragilização e posterior quebra e perda da coluna capilar de separação [5].

De forma geral, CEC apresenta vantagens interessantes em relação à HPLC e à CE. Segundo Altria *et al.* [5], o menor consumo de solventes e de amostra indica que esta técnica pode ser usada em escala de rotina. Além do tão enfatizado e nem sempre necessário aumento de eficiência proporcionado por CEC em relação à HPLC, segundo Cikalo *et al.* [7], a possibilidade de separação de misturas complexas com alta resolução por CEC é uma vantagem mais interessante. A altura equivalente a um prato também aumenta pouco com a mobilidade do fluxo eletrosmótico, homóloga a velocidade linear de fase móvel em HPLC, o que permite que as análises conduzidas por CEC ocorram de forma mais rápida sem perda de resolução e exijam o uso de altos potenciais de corrida para geração de alto campo elétrico. Ainda de acordo com esses autores, outra vantagem de CEC consiste na separação de analitos carregados com maior seletividade, já que esta ocorre tanto por migração eletroforética quanto por interação cromatográfica.

1.2. Parâmetros cromatográficos em CEC

A eficiência em CEC é determinada pelo cálculo do número de pratos (N) estabelecidos dentro da coluna de separação, ou seja, quanto maior for o valor de N, maior o número de equilíbrios estabelecidos entre os analitos e a fase estacionária no interior do capilar, o que possibilita uma melhor resolução entre os picos.

O número de pratos de uma coluna pode ser calculado segundo a equação 2, sendo um parâmetro dependente do tempo de migração do composto (t_m) e da

largura da base do pico (w_B) ou da largura do pico a meia altura (w_h) . É medido sempre em relação ao composto mais retido, ou seja, ao último a eluir da coluna de separação.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_m}{w_h}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_m}{w_B}\right)^2$$
(Equação 2)

Observando a equação 2, entende-se que quanto maior for o tempo de migração do composto e menor for a largura da base, maior será o número de pratos e, portanto, maior o número de equilíbrios estabelecidos entre o analito e as fases móvel e estacionária, o que implica em uma maior eficiência de separação da coluna capilar.

Além desse parâmetro, há a altura equivalente a um prato (*H*), que está diretamente relacionada ao número de pratos pela equação 3.

$$H = \frac{L_{ef}}{N}$$
(Equação 3)

Na equação 3, o L_{ef} em eletrocromatografia capilar é a distância entre a extremidade inicial da coluna capilar e a janela de detecção, também chamado de comprimento efetivo da coluna, já que a separação dos analitos ocorre antes de ser atingido o ponto em que os mesmos serão detectados. Quanto menor a altura equivalente a um prato, maior será o número de pratos que a coluna apresenta, sendo maior a eficiência da mesma.

A relação entre a altura de prato e a velocidade linear ou a velocidade do fluxo eletrosmótico (v, razão entre o comprimento da coluna e o tempo de migração do composto não retido) com que a fase móvel atravessa a coluna é estabelecida pela equação de van Deemter, correspondente à equação 4 [26].

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$
 (Equação 4)

Na equação 4, os parâmetros *A*, *B* e *C* são constantes relacionadas, respectivamente, aos caminhos múltiplos existentes na fase estacionária, à difusão longitudinal e à transferência de massa [27,28].

O termo *A* independe da velocidade linear da fase móvel e corresponde ao efeito dos caminhos múltiplos (dispersão de Eddy) existentes na fase estacionária, que é porosa. Para obter o menor valor de *H*, é necessário que seja minimizado o termo *A* com a utilização de colunas de diâmetro interno pequeno, bem recheadas com partículas ou com monolitos, que formem material uniforme em seu interior.

O termo *B*, inversamente proporcional à velocidade linear, corresponde à difusão longitudinal, ou seja, está relacionado com a difusão molecular do analito pela fase móvel. Este termo também é relacionado à vazão da fase móvel: quanto maior for o seu valor, menor será *B*, pois menor será o tempo necessário para ocorrer a difusão do analito.

O termo C, diretamente proporcional à velocidade linear da fase móvel, refere-se à resistência à transferência de massa, ou seja, à passagem de material de analito da fase estacionária para a fase móvel. Quanto menor o tamanho da partícula que constitui a fase estacionária, menor será o valor de C, pois menor será a resistência para transferir o soluto entre a fase estacionária e a fase móvel.

Em CEC, o termo A é bastante reduzido por causa da possibilidade de utilizar partículas de recheio com diâmetro muito pequeno sem causar aumento de pressão no sistema, já que a fase móvel e os solutos são impulsionados por EOF e este não é influenciado pelo tamanho da partícula, como pôde ser observado na equação 1 [3,13,15,22,29,30]. O menor valor de A, segundo Faria *et al.* [31], é obtido quando há fases com poros bastante largos que auxiliam na rápida transferência de fase móvel e solutos pela coluna capilar. Para Jiskra *et al.* [16], a lentidão, isto é, a resistência à transferência de massa determina o valor do termo C.

Em HPLC, o transporte de solutos é feito por difusão pela fase estacionária. Em outras palavras, a velocidade da fase móvel no espaço interparticular é muito maior que no espaço intraparticular ao passo que, em CEC, o EOF intraparticular transporta os solutos entre o fluido intersticial e os sítios porosos dentro das

partículas por convecção, o que contribui para um menor valor de *C* para CEC em relação à HPLC, dado tanto menor quanto maior o tamanho dos poros [8,32]. O termo *C* assume valores ainda menores que *A* em CEC devido ao uso de capilares de diâmetro muito reduzido (escolhidos a fim de evitar o aquecimento por efeito Joule), o que diminui em grande proporção a resistência à transferência de massa soluto-fase estacionária – assim, essa transferência ocorre em maior velocidade, reduzindo o tempo de análise. A redução dos termos *A* e *C* ocasiona queda no valor de *H* e consequente aumento da eficiência de separação quando é utilizada CEC [8]. Dessa maneira, o termo que mais contribui para o aumento de *H* é o *B*, que existe em qualquer uma das técnicas de separação [28].

O fato de o EOF não depender do tamanho de partícula faz com que haja uma grande vantagem de CEC sobre HPLC, tornando possível preencher o capilar com partículas de pequeno diâmetro sem haver o problema de aumento significativo de pressão [33]. O tamanho da partícula não pode, porém, ser reduzido bastante, para não provocar a sobreposição de dupla camada elétrica e a interrupção de fluxo de fase móvel [30].

Ao considerar que existem diferentes contribuições para a dispersão de banda em CEC e que estas são aditivas, chega-se à equação 5, que reúne cada um dos fatores influenciadores da altura de prato de uma separação.

$$H = H_{disp} + H_{e,diff} + H_{i,diff} + H_{t,diff} + H_{kin}$$
(Equação 5)

Segundo Bartle e Myers [3], H_{disp} refere-se ao incremento na altura de prato causado por dispersão axial do soluto no espaço intersticial; $H_{e,diff}$, à contribuição da resistência do filme na fronteira entre partículas; $H_{i,diff}$, à contribuição da difusão intrapartícula; $H_{t,diff}$, à contribuição da transferência de massa transcanal; H_{kin} , à contribuição da cinética de interação entre o soluto e a fase estacionária.

Basta conhecer a altura de prato e a velocidade linear da fase móvel para ser possível a construção da curva de van Deemter ($H \ge v$) para uma dada coluna de separação. A Figura 4 mostra uma hipotética curva de van Deemter.



Figura 4. Curva de van Deemter hipotética.

Um termo bem menos usado que os anteriores é a impedância de separação, citada por Eeltink *et al.* [34]. Este parâmetro relaciona eficiência, velocidade de fluxo eletrosmótico e pressão, gerando uma combinação direta entre altura de prato e resistência ao fluxo de fase móvel. De acordo com McCalley [35], a impedância de separação é usada para comparar fases com diferentes tamanhos de partículas, sendo menos importante e útil para fases monolíticas.

Além dos parâmetros descritos, há o fator de retenção *k* da coluna. O parâmetro *k* consiste na diferença entre os tempos de migração do composto mais retido e do composto não retido (para isso, usa-se, geralmente, tioureia) dividida pelo tempo de migração do composto não retido. Em HPLC, *k* pode apresentar três utilidades diferentes: medida da posição do pico eluído, uso em estudos termodinâmicos para medir distribuição de massa do eluato entre a fase móvel e a estacionária, e cálculo de fator de retardação cromatográfica [36]. Segundo Rathore e Horváth [36], o fator de retenção em CEC não deve ser analisado da mesma forma que em HPLC, pois em CEC o mecanismo de separação dos analitos é duplo e consiste em uma combinação entre a migração eletroforética e a retenção cromatográfica. Assim, deve ser considerado o fator velocidade de CE para que uma definição mais adequada de *k* para CEC seja obtida. Esse fator velocidade, por sua vez, é um fator complicador que dificulta a compreensão de *k*

para CEC. Com isso, em CEC não existe um parâmetro único equivalente à k de HPLC, que determine a retenção cromatográfica, já que esta não existe isolada no sistema eletrocromatográfico. Colón *et al.* [37] afirmam, ainda, que o fator de retenção não é válido para CEC da forma como se define para HPLC. Para esses autores, o fator de retenção para CEC, chamado k^* , deve ser expresso de acordo com a equação 6, em que μ_{ep} e μ_{eo} correspondem à mobilidade eletroforética e à mobilidade do fluxo eletrosmótico, respectivamente, e sua razão, ao fator velocidade citado em trabalho anterior [36].

$$k^* = k + k \left(\frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo}}\right) + \left(\frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo}}\right)$$
(Equação 6)

Assim, em caso de análise de espécies carregadas, o cálculo de k^* é mais complicado devido à dificuldade na obtenção do valor de μ_{ep} , que não é determinado apenas com base em dados fornecidos pelo eletrocromatograma e pode ser afetado por obstáculos decorrentes do leito recheado. Quando a análise eletrocromatográfica envolve apenas analitos neutros, o valor de k^* se iguala ao valor de k, pois os analitos que não apresentam carga, também não exibem mobilidade eletroforética, sendo movidos ao longo da coluna pela existência do fluxo eletrosmótico. Por conta disso, para analitos neutros, k pode ser calculado como em HPLC, porém, não pode ser interpretado da mesma forma. A partir do momento em que há um meio de análise diferente de HPLC, ou seja, um meio em que é aplicada uma diferença de potencial para gerar o fluxo eletrosmótico, necessário para a movimentação das espécies, o fator de retenção k calculado em CEC se torna levemente diferente daquele calculado se a técnica aplicada fosse HPLC. Segundo Colón et al. [37], a existência do campo elétrico no ambiente de análise provoca modificações na fase estacionária suficientes para gerar pequenas alterações na distribuição dos equilíbrios entre analito e fases móvel e estacionária ao longo da coluna, alterando, assim, o valor de fator de retenção se comparado ao calculado em condições similares de análise em HPLC. Esse mesmo raciocínio foi apresentado no trabalho de Mistry et al. [8]. Por este motivo,

no presente trabalho, que enfoca a separação de analitos neutros, o cálculo do fator de retenção foi realizado como se fosse em HPLC, porém sem a interpretação usualmente elaborada para esta técnica de separação.

A técnica de CE geralmente resulta em maiores eficiências que HPLC, mas sofre de menor resolução e seletividade. Além disso, é necessário, em CE, a otimização de um grande número de parâmetros – sendo o pH e a concentração do eletrólito de corrida os principais – para haver alta seletividade. Ao empregar CEC, torna-se possível separar não somente analitos carregados, como também analitos neutros e, principalmente, analitos insolúveis em meio aquoso. Esta versatilidade se deve à possibilidade de uso de tampões orgânicos, além do fato de a fase móvel não ser eletrólito puro como em CE, mas uma mistura de solvente orgânico com eletrólito de corrida [16]. De acordo com Smith e Carter-Finch e Jiskra et al. [4,16], o modificador orgânico mais usado em CEC é a acetonitrila, já que o metanol caracteriza-se por fornecer separações menos eficientes e diminuir o tempo de vida da coluna de separação. Segundo Krull et al. [1], separações mais longas também são esperadas quando se utiliza metanol ao invés de acetonitrila como modificador orgânico. Além disso, segundo Deyl e Svec [38], a acetonitrila tem maior constante dielétrica e menor viscosidade que o metanol, favorecendo seu uso na composição da fase móvel. Como há solução tampão na fase móvel, é possível gerar o EOF.

O uso de eletrólitos em altos valores de pH não provoca a degradação do leito cromatográfico como em HPLC; ao contrário, proporciona maior EOF e maior velocidade de análise. Entretanto, o pH de trabalho é quase sempre 8,0, pois acima deste valor o fluxo eletrosmótico pode ser considerado constante, e, geralmente, são escolhidos eletrólitos de baixa condutividade e que podem ser usados em maiores concentrações, como o Mes (ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado) e o Tris, indicados para reduzir problemas relacionados à falta de repetibilidade em tempos de retenção [7,37]. A quantidade de recheio de fase estacionária também é menor em colunas capilares do que em colunas de uso convencional em HPLC.

1.3. Tipos de fases estacionárias em CEC

Como foi possível perceber, muitos parâmetros estão envolvidos na otimização de separação por CEC, destacando-se o potencial aplicado para que ocorra a separação, a composição da fase móvel, o tipo de eletrólito de corrida, a temperatura da coluna, as dimensões da coluna capilar e, principalmente, a fase estacionária. Segundo Pursch e Sander [39], a fase estacionária pode ser considerada o "coração" da técnica e, para cada tipo de aplicação, indica-se a utilização de determinado tipo de fase estacionária.

As três principais colunas capilares usadas em CEC são as recheadas com partículas, as tubulares abertas com parede recoberta (*wall-coated open-tubular*) e as moldadas com material monolítico.

1.3.1. Colunas recheadas com partículas

As colunas recheadas com partículas de sílica, também chamadas de particuladas, são as mais utilizadas desde o início do desenvolvimento da técnica de CEC, já que o capilar é preenchido com partículas semelhantes às usadas nas colunas de separação para HPLC. As partículas que compõem a fase estacionária possuem formato esférico de diâmetro na faixa de 1,5 a 10 µm. Quanto menor for o tamanho da partícula, maior será a eficiência de separação, porém menor será a permeabilidade da fase móvel na fase estacionária, com a possibilidade de sobreposição de duplas camadas elétricas pertencentes à superfície das partículas – algo que prejudica a separação e leva à interrupção da análise [21].

Para Altria *et al.* [5], há três procedimentos diferentes para o recheio com partículas de colunas capilares: o modo pressurizado, o ultrassônico e o eletrocinético. O mais utilizado é o primeiro, em que a solução pastosa de partículas com solvente – *slurry* – recheia a coluna com o auxílio de uma bomba de HPLC. Já o modo ultrassônico promove o recheio da coluna com o auxílio de uma sonda ultrassônica, permitindo que o *slurry* preencha a mesma de forma homogênea. Com o modo eletrocinético, é possível introduzir as partículas para o

interior da coluna de separação por meio da aplicação de uma diferença de potencial. Este modo é vantajoso no preenchimento de colunas com pequenas partículas, com as quais seria necessária alta pressão para rechear a coluna no modo pressurizado.

Dependendo do tipo de recheio da coluna, há um determinado tempo de vida para a mesma. Nos trabalhos de Szumski e Buszewski [25] e Tang e Lee [21], existe uma descrição detalhada sobre as diferentes formas de rechear uma coluna capilar com partículas e sobre os cuidados a serem tomados no ato desses procedimentos de recheio.

A grande limitação no uso de colunas capilares recheadas com partículas é a sinterização dos filtros retentores de fase estacionária, comumente chamados de *frits* [21]. Segundo Cikalo *et al.* [7], os *frits* podem ser sintetizados por reação de solução de silicato de sódio com formamida ou, no método mais utilizado, pelo uso de um elemento aquecedor elétrico ou microtocha que funde a fase estacionária na região em que ele será criado. As condições de preparo dos *frits* devem ser otimizadas de acordo com o tipo de sílica de que a partícula é formada. De acordo com Mistry *et al.* [8], a permeabilidade dos frits depende de seu comprimento, do tempo de aquecimento durante sua síntese e do método utilizado para tal.

Os *frits* devem existir na extremidade inicial da coluna e na região imediatamente anterior à janela de detecção. Eles são produzidos de forma a apresentar grande resistência sob alta pressão quando ocorre o fluxo de fase móvel, o que também exige que sejam porosos, para que permitam a passagem da fase móvel. Porém, sintetizar os filtros com repetibilidade é um grande desafio na fabricação desses tipos de colunas. Além disso, eles são os principais responsáveis pela formação de bolhas de ar no interior do capilar, já que se localizam na região de transição entre as partes recheada e não recheada do capilar, causando diminuição do EOF. Os filtros causam variação de retenção de analitos e perda de eficiência, o que pode ser atribuído à sua baixa repetibilidade de síntese [39]. A presença do filtro retentor aumenta em grande proporção a fragilidade da coluna de separação, uma vez que o uso constante do capilar em contato com a fase móvel, que contém solvente orgânico, facilita a quebra do

capilar perto do filtro, tornando a coluna inutilizável para uma posterior separação – para a construção do *frit* também é necessária a remoção da cobertura de poliimida do capilar [28]. Além de todos os fatores mencionados anteriormente, os filtros podem exercer o efeito memória, ou seja, podem se contaminar com a amostra injetada e, em uma análise posterior, sujar uma nova amostra e, consequentemente, o eletrocromatograma, devido ao surgimento de picosfantasma. Assim, a coluna particulada pode ser considerada pouco estável para um grande número de análises. Por este motivo, diferentes formas de síntese dos *frits* foram desenvolvidas, como aquela proposta por Baltussen e van Dedem [40], autores que focaram no desenvolvimento de colunas particuladas sem *frits*. Em outras palavras, houve o acoplamento de capilares de diâmetros internos diferentes, o que permitiu a criação de regiões de retenção das partículas da fase estacionária. Nesse método, foi necessária a remoção da poliimida apenas na região da janela de detecção, gerando uma coluna de estabilidade mecânica similar àquela utilizada em CE.

Oguri *et al.* [41] desenvolveram um nova maneira para fabricar os *frits.* Nesse método, partículas micromagnéticas são utilizadas para a sinterização dos *frits.* As colunas preparadas com esses filtros retentores foram caracterizadas por CEC e comparadas àquelas preparadas com os *frits* convencionais. As colunas foram recheadas com partículas de octadecilsilicato (ODS) e foram avaliadas por meio de testes de durabilidade e estabilidade. O teste de durabilidade verificou a estabilidade física do *frit* por meio de fluxo de metanol, tendo o auxílio de uma bomba de HPLC. Colunas que necessitaram de altas vazões para a passagem do solvente apresentaram os *frits* mais frágeis. O teste de estabilidade avaliou o tempo de vida da coluna, promovendo corridas eletrocromatográficas em 8 h por 7 dias. Durante esse teste, os *frits* não se modificaram. Este resultado já era esperado pelo fato de o filtro fabricado com partículas micromagnéticas ser uma espécie de cerâmica, estável física e quimicamente. Além disso, esse tipo de filtro evita a formação de bolhas. Assim, os autores desse trabalho concluíram que o uso dos novos *frits* é muito vantajoso devido ao fácil preparo e à maior

estabilidade que fornecem à coluna capilar particulada, conhecida por apresentar curto tempo de vida.

Outra proposta de síntese diferenciada de *frits* foi feita por Rocco e Fanali [42]. Esses autores desenvolveram um tipo de *frit* diferente para ser sinterizado no início da coluna (*inlet*) por termopolimerização. O *frit* na região final da coluna (*outlet*) foi sinterizado de forma convencional. As colunas foram recheadas com partículas do tipo C18, sendo comparadas com colunas que apresentam os dois *frits* sinterizados de forma convencional. Notou-se que, quanto maior a temperatura na síntese do *frit*, maior é o tamanho dos canais formados nessa região, e mais poroso é o filtro. Assim, o uso de temperaturas mais altas levou ao uso dessas colunas em CEC na ausência de pressão externa e reduziu a possibilidade de formação de bolhas. O fácil preparo e a alta permeabilidade dos filtros retentores fazem com que esse novo método de síntese seja uma alternativa interessante para a sinterização de *frit* na região *inlet*, sendo que este deve ser protegido com uma camada de poliimida para aumentar a resistência mecânica dessas colunas capilares.

Angus *et al.* [43] avaliaram parâmetros envolvidos no desenvolvimento de processos que otimizassem a fabricação de colunas particuladas para uso em CEC, e gerassem colunas de alta eficiência, livre de espaços vazios entre as partículas. As colunas capilares foram recheadas com partículas Spherisorb ODS-1 (C18), tendo cada coluna 75 µm de diâmetro interno. Os parâmetros alterados para avaliar o recheio das colunas foram os solventes usados para recheio e a forma de preparo do *slurry*. O comportamento do recheio foi analisado, porém o grupo de pesquisa concluiu que não há métodos definidos para determinar o quão homogêneo se encontra o leito cromatográfico para CEC.

1.3.2. Colunas tubulares abertas com parede recoberta

A coluna tubular aberta com parede recoberta se caracteriza por apresentar fase estacionária cobrindo apenas a parede interna do capilar como um fino filme, o que diminui grandemente a capacidade de amostra da coluna. Além da baixa

capacidade de amostra, as fases estacionárias desses tipos de colunas apresentam pequenos valores para fatores de retenção devido à menor área e à menor densidade de ligantes na superfície da fase [8]. Com isso, o uso de colunas tubulares abertas tem se reduzido cada vez mais – hoje, elas são aplicadas apenas em casos selecionados, como na determinação de pureza óptica de produtos farmacêuticos [44,45]. Por outro lado, Krull *et al.* [1], em seu trabalho, citam algumas vantagens desse tipo de colunas capilares, como o pequeno alargamento de banda associado à ausência de material que as recheiem completamente, o que reduz a altura de prato.

No trabalho de Eeltink et al. [45], foram sintetizadas colunas tubulares abertas com a parede interna recoberta por uma camada de monolito poroso, constituído por butilmetacrilato e etilenodimetacrilato como monômeros. O solvente 1-octanol foi utilizado como agente porogênico. A polimerização foi fotoiniciada e houve rotação do capilar para que a polimerização ocorresse de forma homogênea. Foram estudados os efeitos da fase móvel na mobilidade eletrosmótica, do volume de amostra e da espessura da camada de fase estacionária na retenção e na eficiência de separação. Além disso, a fim de aumentar a intensidade do fluxo eletrosmótico, foram enxertados diferentes monômeros carregados, como o ácido 2-acriloilamido-2-metilpropanossulfóxido (AMPS) e o cloreto de 2-(metacriloiloxietil-trimetilamônio) (META) – este último mudou o sentido do EOF. Esta modificação da superfície da fase estacionária é chamada de *photografting* (enxerto de diferentes grupos funcionais por meio de radiação que, neste caso, foi UV). O aumento de temperatura e a aplicação de pressão durante a análise eletrocromatográfica geraram separações mais rápidas, por diminuir o fator de retenção dos analitos, os quais foram separados com adequada resolução. Um aumento em retenção foi observado conforme ocorreu o aumento na espessura da fase estacionária, o que aumentou a área superficial disponível para interação com os analitos. Este aumento acentuado em retenção ocasionou, ao mesmo tempo, maior alargamento de bandas e elevação na altura equivalente a um prato.

Pesek e Matyska [46] exploraram um novo formato de colunas tubulares abertas em seu trabalho. Diferentes fases estacionárias foram preparadas com distintos grupos funcionais: colesterol, octadecil e fenil-1-buteno. Para superar desvantagens, como baixo alcance analito-fase estacionária e menor quantidade de amostra, uma nova forma de preparo dessas fases foi idealizada com o aumento de temperatura e o uso de bifluoreto de amônio durante a sua síntese. O uso deste reagente provocou aumento de área superficial disponível para interação com os analitos e a redução na quantidade de silanóis da coluna, ou seja, no número de sítios de adsorção, que só contribuem para o alargamento da banda dos analitos. Além disso, houve aumento da capacidade de amostra e, assim, possibilidade de variar a seletividade da fase estacionária, com a hidrosililação de sua superfície por meio da ligação de grupos orgânicos (sítios estáveis para interação com os diferentes analitos).

Em outro trabalho, Pesek et al. [47] também sintetizaram uma fase estacionária de sílica usando bifluoreto de amônio em alta temperatura a fim de que ocorresse aumento na área superficial. A superfície da fase foi quimicamente modificada com grupos C5, C18, diol e colesterol, o que determinou a seletividade de separação da fase estacionária. Os sítios orgânicos foram incorporados à superfície por meio da modificação da mesma pelo método de silanização/hidrosilação, em que se forma uma camada de hidreto. Efeitos de pH foram estudados neste trabalho para determinar as contribuições da mobilidade eletroforética, fluxo eletrosmótico e interações entre analito e fase estacionária na migração dos solutos. Conforme ocorre aumento de pH do meio, o fluxo eletrosmótico muda de anódico para catódico. A avaliação eletroforética dessas colunas ocorreu com a separação de pequenas moléculas polares, sendo em de grande parte analitos hidrofílicos importância metabólica, como neurotransmissores, nucleotídeos, nucleosídeos e aminoácidos. Foi possível notar que os valores de eficiência e simetria de picos são funções do grupo ligado à superfície da fase estacionária.

1.3.3. Colunas moldadas com material monolítico

As fases monolíticas foram inicialmente empregadas em cromatografia gasosa (GC) e HPLC no início da década de 1970. Porém, por duas décadas, a técnica de síntese dessas fases foi preterida em função da dilatação e do amolecimento do material monolítico quando estava em contato com solventes orgânicos. Foi apenas no final de 1980, com Hjertén *et al.* [48], que as fases monolíticas voltaram a ser desenvolvidas. Para CEC, o desenvolvimento de monolitos ocorreu a partir do início da década de 1990 e se popularizou em 2000 [7,31,49].

A fase monolítica pode ser definida como um meio contínuo de separação, e considerada uma partícula única, formada dentro do capilar e ligada quimicamente às suas paredes, sem a necessidade, dessa forma, de sinterização de *frits* para reter a fase estacionária. Essa partícula única é altamente porosa, composta por pequenos domínios e grandes canais, chamados macroporos. No meio deles flui a fase móvel e nos pequenos domínios há meso e microporos cuja área superficial é a região que estabelece interações diferenciais com os diferentes analitos. Nestes poros menores, a fase móvel é estagnada e os solutos devem migrar para essas regiões para acessar os sítios ativos de adsorção [50]. Monolitos, de forma geral, consistem em microglóbulos interconectados que se agregam parcialmente em grandes *clusters*, formando o leito monolítico [51,52].

O simples preparo das fases monolíticas em uma única etapa permite a incorporação de diferentes espécies iônicas, carregadas positiva ou negativamente para gerar o EOF desejado, além da possibilidade de controle de funcionalidade (incorporação de diferentes moléculas, hidrofóbicas, hidrofílicas ou que estabeleçam interações específicas) e de propriedades porosas [7,31,53-55]. Além da flexibilidade do formato do molde em que pode ser fabricado o material monolítico [56].

Os monolitos podem ser de dois tipos: inorgânicos à base de sílica ou orgânicos à base de polímeros. Estes últimos são bem mais utilizados que os de sílica por seu preparo mais fácil e porque há uma grande variedade de monômeros disponíveis comercialmente para síntese de polímeros com diferentes

funcionalidades [44,51,57]. As colunas monolíticas à base de sílica são preparadas por meio da tecnologia sol-gel [10,29,58-63], e as colunas monolíticas orgânicas podem ser à base de acrilato ou metacrilato, acrilamida e estirenos [33, 50,52,64-147]. A diferença fundamental entre monolitos orgânicos e inorgânicos, segundo Greiderer *et al.* [148], consiste na fração de mesoporos existentes na fase estacionária monolítica. Para Nischang *et al.* [149], em termos cromatográficos, a diferença essencial entre esses dois tipos de monolitos está mais relacionada ao processo de transferência de massa. Esta diferença fica mais evidente quando separações de pequenas moléculas estão em pauta. Em outras palavras, como os monolitos orgânicos, a resistência à transferência de massa é maior nesta estrutura monolítica do que naquela existente em polímeros, pois as moléculas tendem a penetrar em poros com tamanho similar ao delas [150]. Ou seja, monolitos de sílica são mais adequados para separar moléculas pequenas do que os monolitos poliméricos orgânicos.

Cada vez com mais intensidade, busca-se a separação de moléculas pequenas por meio de monolitos poliméricos. A maior limitação desses monolitos com relação a esse tipo de separação não está na otimização de propriedades morfológicas e estruturais, nem no alcance de maiores áreas superficiais - as quais se encontram, principalmente, em monolitos à base de metacrilato, na faixa de 1 a 6 m² g⁻¹ [105,109,146]. Está, sim, no aperfeicoamento do processo de transferência de massa para que haja a menor dispersão possível das moléculas (por esse motivo, o termo C, referente à transferência de massa, é o maior causador de alargamento de banda na separação de pequenas moléculas). O termo C não só depende da fração de micro e mesoporos que são formados no material monolítico, mas também da distribuição desses poros acontecer de forma homogênea ao longo do leito monolítico, fato que está diretamente relacionado à forma de controle do processo de polimerização, principalmente quando este ocorre por geração de radicais livres [149]. Mesmo assim, muitos estudos, como o de Huo et al. [20], exploram maneiras diferentes de aumentar a área de superfície como uma das formas para tornar os monolitos poliméricos aptos para a

separação de pequenas moléculas. Entre as diferentes formas, estão a copolimerização de diferentes alquildimetacrilatos com octadecilmetacrilato, o preparo de estruturas hiperentrecruzadas e, também, o aumento da concentração de um único monômero entrecruzador, a exemplo do trabalho de Li *et al.* [65], em que foi possível separar alquilbenzenos e parabenos por meio de eluição por gradiente por RPLC.

Atualmente, uma nova classe de monolitos está em expansão: são os monolitos híbridos organo-sílica [150]. Esses monolitos apresentam uma ligação covalente entre a parte orgânica (trialcóxisilano organo-funcionalizado) e a parte inorgânica (tetraalcóxisilano) estabelecida em uma única etapa de preparo. Com isso, esses monolitos incham menos que os orgânicos na presença de solventes orgânicos, sendo altamente resistentes química e mecanicamente.

Conforme citam Moravcová et al. [50], os monolitos de sílica mostram eficiência e capacidade de amostra similar a materiais particulados de 5 µm de tamanho, além de uma pequena resistência ao fluxo de fase móvel, permitindo análises mais rápidas em HPLC. No entanto, os monolitos de sílica são menos usados na comunidade científica – como se pode notar ao realizar uma busca na literatura por causa da maior dificuldade de preparo [28]. Esta dificuldade aumenta em colunas com menos de 4 mm de diâmetro interno, já que o meio de sílica pode encolher durante o processo de síntese. Segundo Yan et al. [29], os fatores que influenciam a síntese desses monolitos por meio da tecnologia sol-gel são as quantidades de catalisador empregada, de solvente (geralmente polietilenoglicol), de água e dos precursores da fase monolítica (os mais usados são tetraetoxisilano e tetrametoxisilano). O modo mais comum de síntese, segundo Klodzinska et al. [64] é a catálise ácida do processo sol-gel, que envolve reação de condensação e policondensação do precursor alcóxido. Com isso, forma-se uma estrutura característica do esqueleto de sílica, sendo que os macroporos definem a porosidade e a permeabilidade do material e os mesoporos determinam a área de superfície específica - entre essas duas propriedades deve existir um balanço, assim como, consequentemente, entre a quantidade de macro e mesoporos no material monolítico, tanto orgânico quanto inorgânico [20]. De acordo com

Moravcová *et al.* [134], a formação do monolito de sílica se baseia na criação de uma rede contínua sol-gel, originada pela geleificação de uma solução sol dentro do capilar. A tecnologia sol-gel serve para aglutinar partículas de sílica ao longo do leito da coluna e esse processo de síntese pode ser utilizado para preparar colunas particuladas.

Por apresentarem alta fração de mesoporos, monolitos de sílica são materiais de fase estacionária ideais para separar pequenas moléculas e peptídeos [149], como citado anteriormente. Porém, eles se revelam pouco interessantes para preencher canais de dispositivos microfluídicos – *chips* – por terem falta de homogeneidade radial, limitada tolerância a pH e processo de produção sensível e complexo [149]. Além destas desvantagens, Umemura *et al.* [135] citam em seu trabalho a possibilidade de os analitos, principalmente aqueles de caráter básico, serem adsorvidos irreversivelmente na fase monolítica de sílica por causa da presença de silanoatos residuais ausentes no monolito orgânico.

Assim, os monolitos orgânicos são mais usados porque são fáceis de preparar e têm grande disponibilidade de monômeros. Sua síntese baseia-se na mistura de monômeros com agente de entrecruzamento, um iniciador (no caso de termo e fotopolimerização) e agentes porogênicos [20]. A mistura de polimerização contém o monômero funcional responsável pela polaridade resultante do monolito, o monômero ionizável responsável por tornar a superfície dos poros carregada positiva ou negativamente, a fim de que se tenha determinado sentido de EOF e o agente de cruzamento que apresenta uma ou mais ligações duplas a serem quebradas para que seja possível a formação da rede polimérica. Esta mistura é líquida e, por isso, minimiza-se a chance de formação de vazios entre a fase estacionária e a parede do capilar, prevenindo interações indesejadas entre os analitos e os grupos silanoatos da superfície interna do capilar [132,151]. Como a superfície monolítica adquire carga quando os analitos forem iônicos, diz-se que o mecanismo de separação se dará tanto por interação com a fase estacionária quanto por troca-iônica [54,95,106]. Os agentes porogênicos e o iniciador determinam o tamanho e a distribuição dos poros, sendo que, no mínimo, dois solventes são empregados: um responsável pela formação de mesoporos e outro,

de maior estrutura molecular, responsável pela moldagem dos macroporos ou dos canais de fluxo de fase móvel [6,65].

Moravcová *et al.* [50] enfatizaram a facilidade de preparo de monolitos orgânicos em moldes com diâmetro interno entre 0,1 e 0,4 mm. O simples processo de preparo permite que a mistura líquida de polimerização seja confinada diretamente dentro de um molde de dimensões flexíveis, evitando alargamentos de banda provenientes da presença de *frits*, como em colunas particuladas [151]. Entretanto, não é aconselhável o uso de colunas de maior diâmetro interno, que apresentam um gradiente de temperatura intenso, já que o processo de polimerização é exotérmico e podem formar estruturas não uniformes ao longo do leito. Assim, a chance de serem formados grandes espaços vazios ao longo do leito monolítico é alta (estrutura não-homogênea), o que prejudica a eficiência de separação [20]. Umemura *et al.* [135] concordam com a faixa de diâmetro interno ideal para uso em CEC, que deve se encontrar entre 75 e 320 µm, faixa na qual o processo de polimerização do monolito ocorre de forma adequada (em diâmetros menores há dificuldade em encher a coluna capilar com o líquido precursor).

Karenga e El Rassi [116,152] estudaram as desvantagens em se ter carga – proveniente do monômero ionizável – na superfície da fase estacionária para a separação de analitos carregados. A presença da carga limita, geralmente, a aplicação das fases monolíticas na separação desses analitos. Quando os analitos apresentam a mesma carga da fase estacionária ocorre repulsão eletrostática, o que impede que todas as interações possíveis sejam estabelecidas com o monolito, gerando separações rápidas, com poucos pratos, isto é, pouco eficientes. Por outro lado, quando os analitos têm carga oposta, além de interagirem com a fase, eles são atraídos eletrostaticamente pela carga na superfície da fase e ficam bastante retidos, ocasionando cauda nos picos e, consequentemente, alargamento de bandas e baixa eficiência. Essas conclusões também são ilustradas no trabalho de Belenkii [32]. Segundo ele, se há repulsão entre analitos e carga da superfície da fase estacionária, ocorre interferência da interação do analito com os centros de retenção do monolito. A solução, de acordo

com Karenga e El Rassi [116,152], é a síntese de monolitos apolares neutros, condição que facilita a separação de analitos carregados em meio neutro ao ser usada eluição isocrática na ausência de interação eletrostática entre a fase e os analitos. Nessas fases monolíticas, a geração do fluxo eletrosmótico se dá por adsorção de íons provenientes da fase móvel ao longo da fase estacionária.

Tanto os monolitos orgânicos quanto os monolitos de sílica preenchem completamente o volume da coluna capilar. Segundo Stulík *et al.* [153], monolitos orgânicos têm poros que variam em tamanho dentro de uma certa faixa, ao se considerar o mesmo tipo de fase estacionária. Já os monolitos de sílica apresentam tamanho de poro mais rigorosamente definido, ou seja, controlados de forma independente [154], o que permite que a descrição de propriedades dos monolitos orgânicos seja mais empírica do que a descrição relativa aos monolitos de sílica [135]. Essa conclusão também remete ao grande problema enfrentado na síntese de monolitos orgânicos: a falta de repetibilidade de suas propriedades cromatográficas, relativa ao preparo de colunas com a mesma fase estacionária, ou seja, com a mesma proporção de todos os reagentes.

Em termos de morfologia de estrutura interna, a diferença entre esses dois tipos de monolitos está no fato de que o inorgânico apresenta material na forma de bastonetes conectados de forma bicontínua, enquanto o orgânico tem material na forma de aglomerados esféricos (glóbulos que formam *clusters*). Nos dois tipos de monolitos, a estrutura e a morfologia dos poros da fase estacionária são peças-chave para o estudo e a análise das suas propriedades termodinâmicas e do processo de separação cromatográfico [155].

A dilatação e o encolhimento do material monolítico orgânico são mínimos diante dos solventes orgânicos que compõem a fase móvel em CEC. A condução desta por EOF permite o uso de polímeros com menor grau de entrecruzamento, já que não há o problema de resistência ao fluxo, observado quando este é induzido por pressão. Ao contrário de colunas particuladas, colunas monolíticas apresentam fluxo eletrosmótico que depende do tamanho dos poros, e a determinação de sua mobilidade pode ser um reflexo da distribuição dos poros ao longo do leito monolítico, se este for homogêneo [7].

Os monolitos orgânicos são quimicamente muito estáveis em ampla faixa de pH (2 a 12), diferente da sílica, que se dissolve em meio excessivamente básico. O controle do processo de polimerização (variação no tipo e na proporção de solventes porogênicos e variação na proporção destes com os monômeros, por exemplo) facilita a otimização das propriedades porosas e, assim, da eficiência e da seletividade de separação [38,154,156].

Os monolitos orgânicos à base de metacrilato são os mais utilizados porque têm maior repetibilidade de síntese, alta homogeneidade de leito, variedade de monômeros que fornecem fases com diferentes polaridades e grande estabilidade química e mecânica, o que aumenta o tempo de vida de colunas preparadas com esse monolito, além de promover separações mais rápidas e eficientes [94,113,153]. Segundo Hilder et al. [157], para otimizar o processo de síntese de polímeros à base de metacrilato, é necessário atentar ao preparo da mistura de polimerização para obter uma única fase homogênea, a partir de monômeros solúveis em água e ionizáveis, e para que haja o suporte ao EOF e esta fase apresente os monômeros hidrofóbicos que afetam diretamente a separação sem o uso de agentes compatibilizantes [38,125,129,149]. Se a mistura de polimerização se tornar turva, este será mais um fator a atuar na redução da repetibilidade de preparo do monolito [80]. A incorporação desses monômeros com polaridades distintas ao monolito macroporoso deve ocorrer de forma uniforme. O fino controle das propriedades porosas – geralmente realizado com variação na natureza e na proporção entre solventes porogênicos devido à ação direta na solvatação das cadeias poliméricas em crescimento durante a polimerização [56,65,135-137,147, 158,159] – deve ser feita com cautela para que se tenha sucesso nas separações. Por fim, a facilidade inicial de lavagem e equilibração do material monolítico diante da fase móvel são essenciais para que separações adequadas e eficientes sejam obtidas [38,50,134].

Antes de proceder com a polimerização, ou seja, com o preparo da fase estacionária, a superfície interna da parede do capilar deve ser preparada para que ocorra a ligação entre o material monolítico e a superfície, para descartar o risco da fase estacionária ser perdida durante a análise com a passagem da

solução. Em outras palavras, é preciso o pré-tratamento da superfície interna do capilar. De acordo com Zou *et al.* [20], é necessária a lavagem da parte interna do capilar com uma solução fortemente básica, que permita que grupos siloxanos sejam hidrolisados e se tenha silanoatos na superfície interna que sirvam como ancoradores para a silanização subsequente, favorecendo o estabelecimento de ligações com o agente silanizante. Esta ligação é essencial para promover a formação *in situ* do polímero entrecruzado sem a necessidade de filtros retentores de fase estacionária, segundo ALOthman [129]. Para Pesek e Matyska [46], a silanização (etapa de pré-tratamento) cria uma nova superfície composta por sítios híbridos para a ancoragem do monolito, garantindo alta força mecânica e contribuindo para que haja boa homogeneidade do leito cromatográfico [49,155].

Segundo testes desenvolvidos por Augustin *et al.* [160], a não realização do pré-tratamento da superfície interna do capilar resulta em não aderência do material monolítico à parede, ou seja, formam-se regiões em que o ancoramento do material monolítico não é possível, o que gera um leito não homogêneo e reduz o tempo de vida da coluna capilar. De acordo com Nischang *et al.* [111], quanto maior o tempo de silanização, maior a adesão do material à parede interna do capilar. Se a síntese for de monolitos de sílica, ainda é necessária uma etapa de hidrosililação para a ligação de grupos orgânicos que variam a seletividade de separação da fase monolítica.

A polimerização radicalar para a formação do monolito orgânico pode ocorrer de quatro formas diferentes: radiação UV, aumento de temperatura (térmica), radiação gama e por agentes químicos [153]. Em termos de homogeneidade do leito cromatográfico, a polimerização via radiação UV é a que fornece melhores resultados, porém, para sua aplicação, é necessário que o recobrimento do capilar seja transparente à luz UV – o que não é o caso dos capilares mais usados em CEC, cujo recobrimento é feito com poliimida – e também que sejam usados solventes voláteis, já que a perda destes por UV é menor que na polimerização térmica [56,70]. O uso da polimerização UV é preferida quando se dá em *microchips*, permitindo que apenas um espaço específico dentro do canal seja polimerizado [154].

Entre as quatro formas de polimerização, a mais comum e usada é a térmica, em que um agente iniciador é adicionado ao meio para que seja possível sua decomposição em radicais livres. A radiação gama [52,118] é usada por alguns grupos de pesquisa, tendo como vantagem o fato de a adição de agente iniciador ser desnecessária e a grande versatilidade que permite o preparo de monolitos de estruturas químicas diferentes, com tamanhos, formatos e características de poros distintas. Zhang *et al.* [58] prepararam monolito de sílica pelo processo sol-gel usando polimerização por radiação gama, pois, na térmica, o tamanho do poro depende da temperatura e, na polimerização por UV, os monolitos apresentam um tamanho de poro limitado; segundo estes autores, a radiação gama prepara o monolito de forma reprodutível e simples, mas apresenta como desvantagem a dependência de uma fonte de radiação gama, cuja obtenção não é simples; e também está fortemente relacionada à taxa de radiação, que deve ser otimizada para que ela ocorra de forma homogênea por todo o capilar. Este último parâmetro também deve ser otimizado caso a polimerização ocorra por UV [160,161].

Assim, os tipos mais usados de polimerização são a por radiação UV e a por aumento de temperatura (geralmente na faixa entre 55 e 80 °C [20]), porque têm a possibilidade de preparo de monolitos de diferentes polaridades [153]. A formação dos poros do material monolítico depende da qualidade termodinâmica dos agentes porogênicos, da temperatura – caso seja polimerização térmica –, da taxa de radiação – no caso da radiação gama e UV –, e do conteúdo de agente de entrecruzamento [57].

Svec e Fréchet [130] estudaram o efeito da variação da temperatura de síntese sobre a formação do material monolítico. Considerando que a mistura de polimerização para formação de monolitos em geral, independente da sua aplicação cromatográfica, é composta por monômeros vinil (precursor) e divinil (entrecruzador, com ao menos duas duplas ligações para formação de núcleos entrecruzados), por solventes porogênicos e por agente iniciador, tem-se que este se decompõe a certa temperatura característica do reagente e que os radicais livres formados iniciam o processo de polimerização em solução.

Vlakh e Tennikova [70], em seu trabalho, descreveram com mais detalhes o mecanismo de formação do material monolítico orgânico, depois que o agente iniciador se decompõe e se inicia a polimerização. Conforme as cadeias poliméricas crescem, a solubilidade do iniciador diminui na mistura de polimerização e, assim, as cadeias poliméricas precipitam para formar núcleos. Como os monômeros são solventes melhores (em termos termodinâmicos) que os agentes porogênicos, os núcleos anteriormente formados se incham na presença dos monômeros. Se a concentração do monômero nos núcleos for maior que na solução ao redor, a polimerização dos núcleos é cineticamente preferencial. A polimerização prossegue, ocorre o aumento do tamanho dos núcleos e formam-se microglóbulos que continuam a crescer e se agregam, dando origem aos *clusters* (aglomerados), que correspondem às unidades morfológicas elementares formadoras do polímero macroporoso. À medida em que os microglóbulos continuam seu processo de crescimento e o agente de entrecruzamento promove a formação das redes entre as cadeias poliméricas, a estrutura morfológica final do monolito é criada. O processo resulta em um sistema de duas fases [56], que consiste em um monolito sólido e branco preenchido por resíduos líquidos dos solventes porogênicos no interior dos poros, já que estes não reagem [123]. O volume ocupado por esses resíduos de porogênicos corresponde ao volume dos macroporos. Para sua eliminação do interior da coluna de separação, é necessário o bombeamento de solvente puro ou combinado com água por meio de uma bomba de alta pressão de HPLC [149].

Se a síntese for submetida a valores mais altos de temperatura (maior taxa de reação), um maior número de radicais livres serão formados e, consequentemente, maior será a quantidade de glóbulos e *clusters*, cujo aumento será compensado pela redução de tamanho, o que diminuirá os canais e, com isso, elevará a quantidade de micro e mesoporos, levando em conta que os domínios do material são porosos [56,130,131]. Assim, o tamanho dos glóbulos pode ser influenciado por uma série de fatores, incluindo o número de sítios de nucleação, a concentração do monômero, a solubilidade e o grau de entrecruzamento [131].

1.4. Caracterização da estrutura porosa de sólidos

A eficiência de separação de uma coluna cromatográfica é altamente dependente da homogeneidade dos poros da fase estacionária. Uma estreita distribuição de tamanho de macroporos é fator fundamental para uma maior eficiência de separação da coluna e, ao mesmo tempo em que uma estrutura porosa altamente uniforme se torna muito útil para a separação de moléculas pequenas [155]. Revela-se essencial, portanto, que a estrutura monolítica porosa seja caracterizada fisico-quimicamente.

Um sólido poroso pode ser caracterizado por medidas de sorção de um gás na superfície de seus poros. Sabe-se que quanto maior a área de superfície do poro ou da partícula, se este sólido for formado por partículas, menor será o tamanho dos poros ou das partículas. Ou seja, é uma relação inversamente proporcional a que existe entre a área superficial e o tamanho do elemento formador do sólido em questão [162].

Quando se questiona sobre a área superficial de um material poroso, é possível diferenciar dois tipos: a área superficial externa e a interna. Segundo Gregg e Sing [162], a primeira corresponde à área de fissuras superficiais que sejam mais largas que profundas. A área de superfície interna, por sua vez, predominante na maioria dos sólidos, envolve fissuras que são mais profundas do que largas, incluindo paredes de todas as possíveis rachaduras, poros e cavidades que o sólido venha a apresentar.

De acordo com a IUPAC [163], os poros podem ser classificados conforme seu tamanho: macroporos, com largura maior que 50 nm; mesoporos, entre 2 e 50 nm; e microporos, com largura menor que 2 nm. Desse modo, os microporos são aqueles que têm alta área de superfície. Os poros podem, ainda, ser classificados de acordo com o seu formato e a sua disposição no material poroso [164], podendo ser fechados ou abertos. Poros fechados são isolados, aqueles que não estabelecem comunicação com o meio externo e, portanto, responsáveis por propriedades macroscópicas como a densidade. Os poros abertos se

comunicam com o meio externo, e mantêm contato com a superfície externa. Quando a comunicação ocorre apenas por uma saída do poro, este é chamado de poro cego. Por causa da comunicação com o meio externo, os poros abertos são os responsáveis pelo estabelecimento de interações com o analito no caso de o sólido poroso ser a fase estacionária de uma coluna de separação cromatográfica. Com relação ao formato, os poros ainda podem ser classificados como cilíndricos, tipo garrafa ou pote de tinta, fenda ou funil.

A caracterização dos poros presentes em um sólido poroso pode ocorrer por meio da adsorção física de gases como o nitrogênio. Este tipo de adsorção, também chamada de fisiossorção, envolve interações intermoleculares que se estabelecem na interface entre sólido e fase gasosa e consiste em um processo reversível. O gás que se adsorve é o adsortivo que, uma vez em interação com a superfície, passa a ser chamado de adsorbato. Por fim, a superfície é chamada de adsorvente. Como a adsorção física envolve apenas interações intermoleculares, é possível que ocorra a formação de mais de uma camada acima da superfície, dando origem a multicamadas de gás. Conforme a pressão do gás é aumentada, intensifica-se o processo de adsorção. A pressão aumenta até que se alcance a pressão de saturação do gás (instante em que todos os poros foram preenchidos) e, aí, inicia-se o processo de dessorção das moléculas de gás e a queda gradativa da pressão.

Quando se controla o volume de gás adsorvido nos poros da superfície do sólido (o que pode ser chamado de volume de poro, já que os poros são preenchidos pelas moléculas de gás) segundo o aumento de pressão a uma dada temperatura, obtém-se uma curva conhecida como isoterma, que apresenta dois ramos distintos – o da adsorção e o da dessorção. Este gráfico apresenta, como variáveis, o volume de gás adsorvido e a pressão relativa, que consiste na razão entre a pressão de equilíbrio do gás (p) adsorvido na interface sólido-gás e a pressão de saturação do vapor (p_0).

Na isoterma obtida por adsorção física, três fenômenos estão envolvidos. Inicialmente, a baixa pressão relativa, o aumento da pressão forma uma monocamada de gás, e começa com o preenchimento dos poros de menor

tamanho. Conforme а pressão aumenta, formam-se outras camadas (multicamadas), o que caracteriza a adsorção multimolecular. Por último, quando a pressão está próxima da pressão de saturação do vapor, tem-se o fenômeno de condensação capilar, em que se considera que os poros são capilares dentro dos quais o gás, em alta pressão, se condensa para líquido e preenche todos os poros. Este fenômeno de condensacão também se caracteriza por ocorrer a uma pressão (p) menor que a pressão de saturação do gás (p_0), ou seja, a razão p/ p_0 é menor que a unidade [113]. Segundo Oscik [165], para compreender de maneira mais adequada as condições determinantes da formação de um filme líquido a partir de vapor de adsorbato nos capilares, é preciso analisar a dependência entre a pressão de vapor de equilíbrio do gás (p) e a curvatura da superfície do líquido (menisco) formada na interface de interação.

Muitas isotermas de adsorção podem ser obtidas, mas a maioria se agrupa em uma das seis classes existentes, sendo as cinco primeiras propostas por Brunauer, Deming, Deming e Teller (BDDT), conhecidas atualmente como isotermas de BET (Brunauer, Emmett e Teller). A classe VI, mais raramente encontrada e associada à adsorção em superfície sólida uniforme, foi proposta por Hill e Halsey [162]. A Figura 5 mostra as seis classes de isotermas.



Figura 5. Os seis tipos de isotermas de adsorção segundo BET e Hill e Halsey [adaptado de 162].

A isoterma tipo I é característica de materiais microporosos, em que um aumento de pressão é acompanhado por um aumento no volume do gás adsorvido, até que este se torne constante, indicando a formação da monocamada de gás. O aumento do volume a baixas pressões se deve ao preenchimento gradual dos microporos conforme aumenta a pressão no sistema [166]. Este tipo de isoterma também é conhecido como isoterma de Langmuir.

Isotermas tipo II são obtidas com sólidos não porosos ou macroporosos, como a adsorção obtida entre benzeno e carvão grafitizado [162]. Isotermas tipo III são características de moléculas de gás cuja interação entre si é maior que entre o gás e a superfície do sólido. Com esse tipo de isoterma não se pode analisar área superficial nem porosidade. Esta isoterma é característica, por exemplo, da adsorção de bromo gasoso em sílica gel [162].

As isotermas tipo IV e V são as únicas que apresentam histerese e que o máximo de adsorção ocorre a uma pressão menor que a de saturação do vapor [165]. Isotermas tipo V são mais difíceis de ocorrer e podem caracterizar materiais mesoporosos, ocorrendo quando as interações adsorbato-adsorvente são fracas, a exemplo da adsorção de hexano ou heptano em alguns tipos de sílica [162].

Segundo Vansant *et al.* [166], isotermas tipo IV são características de materiais mesoporosos, que geralmente apresentam uma distinta histerese em altas pressões, já que o ramo correspondente à dessorção não segue o ramo da adsorção. Para Teixeira *et al.* [167], a histerese será maior quanto maior for a dispersão de tamanhos de poro. A histerese ocorre devido à condensação capilar, que faz parte do processo de adsorção física. Após a formação da monocamada de gás, tem-se uma região em que a pressão relativa varia pouco e o volume de adsorbato aumenta bruscamente. Este fato se relaciona com a formação de multicamadas e consequente condensação capilar, situação em que todos os poros são preenchidos com adsorbato no estado líquido, a começar pelos mais estreitos. A condensação capilar é um fenômeno secundário, já que, para ocorrer, requer a formação anterior de multicamadas. Como o adsorbato condensa dentro dos poros ou capilares, a geometria da interface durante a dessorção será diferente da existente durante o processo de adsorção (situação em que o gás

ainda iria se adsorver na superfície), pois a pressão de evaporação p do menisco (que se forma na interface devido à condensação do gás adsorvido nos poros) não é a mesma da pressão de vapor de saturação do gás p_0 [162]. Assim, o mecanismo de adsorção (condensação) é diferente do mecanismo de dessorção (evaporação) e, por isso, o ramo da adsorção não coincide com o da dessorção, o que ocasiona a formação da histerese. Analisando a histerese formada, nota-se que a quantidade sorvida é sempre maior no ramo da dessorção do que no da adsorção. Segundo Vansant *et al.* [166], a condensação capilar causa um aumento de adsorbato durante o processo de adsorção e uma consequente retardação no processo de dessorção. Diferentes tipos de histereses podem surgir dependendo da estrutura do sólido mesoporoso e da distribuição de poros que ele apresenta.

Ao se levar em conta que a isoterma caracteriza um determinado material poroso, pode-se aplicar um modelo para analisar a curva de distribuição de tamanho de poros, como sugerem a teoria do funcional de densidade, para a descrição de porosidade de sistemas heterogêneos e o modelo BJH (Barret, Joyner e Hallenda), mais utilizado e baseado na aplicação da equação de Kelvin. Com este modelo, que foi utilizado neste trabalho, é possível interpretar curvas de distribuição de poros na faixa de tamanho de mesoporos (a construção dessas curvas só é possível se a isoterma for do tipo II ou IV), obtida tanto pelo ramo da adsorção quanto da dessorção da isoterma, entre a pressão relativa de 0,42 e 0,995. Segundo Gregg e Sing [162], há diferenças no perfil da curva de distribuição de tamanho de poros quando é obtida considerando o ramo da adsorção ou o da dessorção. O perfil resultante a partir do ramo da adsorção gera uma curva com distribuição mais larga, ao contrário do perfil que se obtém com o ramo da dessorção, que gera curvas que refletem de forma mais adequada a estrutura porosa do material em análise. De acordo com Guan-Sajons et al. [168], utiliza-se preferencialmente o ramo da dessorção, pois este corresponde a um estado de menor energia e, portanto, de maior estabilidade. Ainda segundo esses autores, o método BJH usado para a obtenção da curva de distribuição de poros assume que estes são cilíndricos e que o adsorbato pode ser retido nos poros do
material adsorvente por dois mecanismos: adsorção física nas paredes dos poros ou condensação capilar.

Os gráficos referentes à distribuição de poros de acordo com o método BJH apresentam, como variáveis, o volume de gás adsorvido ou o volume do poro *versus* o diâmetro do poro. Na realidade, duas curvas são possíveis, sendo a primeira aquela em que a unidade do eixo das ordenadas é cm³ g⁻¹, e resulta da derivada do volume de poro em relação ao logaritmo do diâmetro de poro. A segunda tem como unidade de ordenada cm³ g⁻¹ nm⁻¹, ou seja, o eixo é dado pela derivada do volume de poro em relação ao seu diâmetro. Esse segundo tipo de curva se mostrou mais adequado para a análise da fração de mesoporos presente no material monolítico, além de ser citado em diversos trabalhos publicados na literatura [169-178] por ser mais facilmente compreendido. A comparação entre essas curvas e os diferentes materiais relacionados se dá em termos de tamanho médio de poro, o que, segundo Vansant *et al.* [166], é de relevância estatística, não refletindo o tamanho atual de poro.

Muitos modelos também foram desenvolvidos para a análise dos microporos existentes em uma estrutura porosa. Segundo Vansant et al. [166], todos eles não visam a encontrar uma curva de distribuição de microporos; apenas confirmam sua presença e, alguns deles, quantificam o volume e a área de microporo, além de fornecer a área de superfície externa, que corresponde à área de mesoporo e é aproximadamente igual à área de superfície obtida pelo método BET [179]. Um dos modelos mais utilizados e mais bem compreendido é o *t-plot*, baseado na comparação da isoterma de adsorção da amostra em estudo com a isoterma padrão medida no material de referência não poroso, de composição química e característica de superfície semelhante às da amostra. A curva obtida pela aplicação do *t-plot* é a t-curva, que consiste em volume de gás adsorvido versus t e significa a espessura estatística de filme de gás que é adsorvido sobre a superfície dos microporos. Em casos comuns de adsorção multimolecular, os pontos da curva caem sobre uma linha reta. Porém, se o adsorvente contiver microporos em sua estrutura, haverá uma distorção da curva na região de baixa pressão (de baixos valores de t), como nas isotermas de adsorção-dessorção.

Quando se ignora o desvio da curva (linha reta) e se extrapola essa linha até o eixo do volume de gás adsorvido, é possível determinar o volume do microporo e, assim, sua área. A inclinação do segmento linear da curva fornece a área superficial externa. Se o desvio da curva ocorrer em valores maiores de t, o material é somente mesoporoso [162,180,181]. A Figura 6 ilustra os perfis característicos da t-curva para cada tipo de material poroso.



Figura 6. Perfis da t-curva para materiais microporosos (A), mesoporosos (B) e não porosos (A e B) [adaptado de 180].

1.4.1. Caracterização da estrutura porosa de materiais monolíticos

A distribuição de tamanho de poros está relacionada com a organização interna dos glóbulos e *clusters* que se formam na estrutura do esqueleto do monolito polimérico, e é fortemente dependente da composição química da mistura de polimerização e das condições reacionais. As variáveis mais efetivas no controle de distribuição de poros são a proporção do monômero de entrecruzamento em relação ao monômero precursor, a natureza e a proporção dos solventes porogênicos, a concentração do agente iniciador da reação de polimerização e o tempo e a temperatura de polimerização [87,124,125,127,128,131,137,147,182].

O mecanismo de formação de poros, de acordo com Vlakh e Tennikova [70], pode ser descrito segundo os solventes porogênicos utilizados. Estes podem ser solventes bons ou ruins. A polimerização se inicia com a formação de uma solução homogênea até que o crescimento e o entrecruzamento das cadeias poliméricas ocorra e estas se precipitem. Quando o agente porogênico é um bom solvente para o polímero final, a separação de fases ocorre tardiamente e os poros são pequenos. Assim, pode-se controlar os poros formados por meio da escolha dos solventes porogênicos de acordo com seus parâmetros de solubilidade, sem descartar o parâmetro polaridade [65].

A morfologia de monolitos macroporosos é um sistema complexo. A estrutura que se forma, que compõe o monolito rígido poroso, é diferente daquela produzida durante a etapa de polimerização em suspensão mesmo que as condições sejam similares. A estrutura do monolito é definida como bimodal, já que é resultado da falta de tensão interfacial entre as fases aquosa e orgânica e da ausência de forças dinâmicas, ambas características da polimerização em solução [183].

Várias são as técnicas utilizadas para avaliar a porosidade dos materiais baseados em monolitos. Entre elas, está a técnica de medidas de adsorçãodessorção de nitrogênio (BET), já discutida anteriormente neste trabalho, a porosimetria por intrusão de mercúrio (MIP) e a microscopia eletrônica de varredura (SEM), que permite apenas a visualização da morfologia da estrutura porosa. Outras técnicas também conhecidas, porém menos utilizadas, são a crioporosimetria por NMR (ressonância magnética nuclear) e a termoporosimetria por DSC (calorimetria diferencial de varredura) [155].

Entre todas as técnicas citadas, a mais utilizada e que fornece o maior número de informações sobre a estrutura do monolito é a de adsorção-dessorção de nitrogênio (BET). Sabe-se que um pequeno volume de solução com o material monolítico é suficiente para preencher a coluna capilar, sendo que armazena-se o restante em um frasco. Tanto a coluna quanto o frasco são submetidos ao processo de polimerização. Porém, apenas com o material do frasco pode ser feita

a análise por porosimetria. Desse modo, para a aplicação da técnica de BET, bem como a MIP, assume-se que o monolito encontra-se completamente seco e que sua estrutura não irá se modificar ao entrar em contato com a fase móvel e, também, que o produto da polimerização que ocorreu em um frasco com a mesma composição da fase estacionária do interior da coluna apresenta a mesma morfologia do monolito sintetizado no interior do capilar, já que o material da fase estacionária não pode ser utilizado como amostra para este tipo de análise [108,119,125,155,184]. Assim, o material levado para caracterização física é seco, enquanto o monolito que preenche a coluna capilar será avaliado eletroforeticamente quando estiver úmido, estado chamado, por muitos autores, de porosidade em gel [137,149]. Durante uma análise cromatográfica, a fase monolítica está em contato com o solvente da fase móvel e, portanto, pode sofrer inchaço ou encolhimento, o que, provavelmente, modifica características e propriedades de superfície do polímero em relação às do monolito completamente seco. Por isso, torna-se difícil e pouco confiável o estabelecimento de relações entre a eficiência de separação e as medidas de área de superfície e volume de poros. Talvez, devido à característica de porosidade em gel, haja dificuldade em justificar menores valores de eficiências de separação obtidas com monolitos poliméricos quando comparadas àquelas de colunas particuladas [137].

Hilder *et al.* [55], em seu trabalho de revisão, descreveram três formas diferentes de avaliar o material monolítico no estado úmido ou "solvatado". A primeira é aplicada em HPLC capilar e consiste na determinação do tempo de eluição de um composto de baixa massa molar não retido para cálculo da porosidade total. A segunda é baseada em medidas de condutividade para estimar a porosidade do material, em outras palavras, compara-se a condutividade em um capilar vazio e em outro com monolito, sendo os dois preenchidos com o mesmo eletrólito de corrida. A última forma de medir a porosimetria é gravimétrica, em que se determina a diferença de massa entre a coluna monolítica seca e a preenchida com acetona. No entanto, nenhum dos três métodos fornecem informações sobre a distribuição de tamanho de poros. Por este motivo, as análises porosimétricas se procedem com o material monolítico no estado seco [38,55]. Segundo Deyl e Svec

[38], pode-se afirmar que existe uma forte correlação entre as propriedades porosas no estado seco e o desempenho cromatográfico do monolito, mesmo ao se considerar que o tamanho de poro determinado pela porosimetria não corresponde ao poro no interior do capilar. Isso indica que a porosimetria serve para mostrar uma tendência na distribuição de tamanho dos poros de um determinado material [125].

A técnica de BET foi usada neste trabalho para avaliar a porosidade da estrutura monolítica orgânica de todas as colunas. Foi avaliada a possibilidade de correlacioná-la com a eficiência de separação calculada para cada coluna capilar, já que há trabalhos na literatura que estabelecem esse tipo de relação, como aquele desenvolvido por Danquah e Forde [87]. Segundo estes autores, que sintetizado utilizam monolito por reacão de copolimerização entre etilenodimetacrilato (EDMA) e glicidilmetacrilato (GMA), o aumento na concentração do solvente porogênico cicloexanol causa aumento de porosidade e, consequentemente, diminuição da área de superfície do poro. Assim, um determinado analito, presente em uma dada amostra, vai interagir com menor quantidade de fase estacionária quanto maior for a concentração de cicloexanol presente na solução de solventes porogênicos da mistura de polimerização. Portanto, a coluna de separação apresentará uma menor eficiência de separação, já que um menor número de equilíbrios serão estabelecidos entre o analito e as fases móvel e estacionária, sendo também menor o número de pratos. Essa mesma conclusão já havia sido alcançada pelo grupo de pesquisas de Peters et al. [86], que desenvolveram um estudo de porosimetria de monolitos preparados com butilmetacrilato, utilizando diferentes proporções de solventes porogênicos (1propanol, 1,4-butanodiol e água).

1.5. Revisão bibliográfica

Estudos extensivos sobre monolitos baseados em metacrilatos foram apresentados por Buszewski e Szumski [27]. Uma de suas colunas capilares foi feita utilizando-se como monômero precursor o octadecilmetacrilato (ODMA) e o

agente de entrecruzamento etilenodimetacrilato (EDMA) na proporção 23,1:76,9% m/m, juntamente com o grupo responsável por gerar carga na fase estacionária, AMPS (0,3%). Os solventes porogênicos utilizados foram 1,4-butanodiol:1propanol 30:70% m/m. A proporção entre monômeros e solventes porogênicos foi de 40:60% m/m. A característica hidrofóbica do octadecilmetacrilato não permitiu que a mistura de solventes porogênicos contendo água se tornasse homogênea daí a ausência de água na composição dos solventes porogênicos. A coluna obtida apresentou grande eficiência, sendo que, sob condições de CEC, mostrou eficiência acima de 116000 pratos m^{-1} – e, sob as de HPLC, caiu para cerca de 70000 pratos m⁻¹. Observou-se que as mudanças na concentração da solução tampão da fase móvel causaram modificação da eficiência da coluna, principalmente quando a concentração passou de 2,5 para 1,0 mmol L⁻¹ de tampão. Este estudo revelou que guanto maior a concentração de AMPS (responsável pela presença do grupo sulfônico na superfície da fase estacionária), maior foi a velocidade de separação dos analitos. Além disso, obteve-se colunas mais eficientes quanto maior o tamanho dos poros do material monolítico.

Outro trabalho sobre o uso de octadecilmetacrilato como monômero precursor foi desenvolvido por Ueki *et al.* [185], que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa para a separação. Esse grupo de pesquisa preparou monolitos por meio de polimerização *in situ* de ODMA e EDMA. A mistura de solventes porogênicos utilizada foi de álcool isoamílico:1,4-butanodiol 80:20% v/v, o que proporcionou uma fase estacionária de alta permeabilidade com adequada eficiência de separação e repetibilidade. A coluna produzida apresentou excelente estabilidade térmica a uma temperatura de 80 °C, na qual o número de pratos (6000 pratos/20 cm, ou seja, 30000 pratos m⁻¹) foi o dobro do apresentado pela mesma coluna em temperatura ambiente. Além disso, o tempo de separação dos analitos foi reduzido a um terço do tempo necessário quando avaliado em temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água 50:50 v/v, em uma vazão de 3 μL min⁻¹. A proporção dos monômeros foi estudada na faixa de 10% a 40%, sendo determinada como condição ótima 25%, levando em conta a eficiência da separação e a resistência em fluxo baixo.

Recentemente foi publicado um trabalho sobre a repetibilidade de preparo de colunas do tipo C18 [138]. Kositarat et al. desenvolveram colunas de poli(octadecilmetacrilato-*co*-etilenodimetacrilato), tendo como solventes porogênicos o álcool isoamílico e o 1,4-butanodiol e, como iniciador, o azobisisobutironitrila (AIBN). Além destes, usou-se o monômero ionizável AMPS. A polimerização ocorrida foi termoiniciada e três formas diferentes de aquecimento foram avaliadas: por forno de GC, por forno de ar aquecido e por banho-maria. A que forneceu boa repetibilidade no preparo das colunas foi a por forno de ar aquecido, que mostrou ter menor desvio padrão relativo nos tempos de retenção para a separação de analitos por LC capilar. Mais que isso, as colunas preparadas apresentaram seletividade adequada para a separação de quatro isômeros de tocoferol em comparação às colunas preenchidas com partículas de sílica do tipo C18 e com monolito de sílica modificado com grupos C18.

Huang et al. [108] prepararam um monolito polimérico a partir da mistura de divinilbenzeno com vários alquilmetacrilatos (C4, C8 e C12), a fim de separar benzofenonas por meio de CEC. O monômero carregado utilizado foi o ácido vinilbenzenosulfônico, tendo como agente iniciador o AIBN. Utilizou-se uma mistura ternária de agentes porogênicos composta por cicloexanol, água e N-metil-2-pirrolidina ou N,N-dimetilacetamida. A superfície das fases estacionárias sintetizadas mostrou não somente sítios de benzenos, como também cadeias alquila flexíveis de comprimento variado. O aumento na cadeia alquila causou maior hidrofobicidade e reduziu a cauda dos picos nos eletrocromatogramas, caracterizando uma retenção mais fraca. Isto ocorreu por causa da redução na interação π - π entre os analitos aromáticos e os sítios de benzeno devido ao impedimento estérico causado por cadeias alquila de maior comprimento. Assim, retenções indesejadas que levam à formação de caudas em picos podem ser amenizadas por meio da adição de alquilmetacrilatos, que balanceiam as interações com os sítios aromáticos sem a necessidade de reduzir a proporção de divinilbenzeno.

Uma nova forma de síntese de monolitos poliméricos orgânicos vem se desenvolvendo nos últimos anos. Ela envolve a inserção de polímeros

porogênicos ao invés de solventes porogênicos. Lav et al. [136] desenvolveram monolitos porosos à base de poliestireno gerados *in situ* por semi-interpenetração de redes poliméricas, seguido pela extração do elemento não entrecruzado que agiu como agente porogênico. O monolito foi sintetizado por combinação de estireno (S) e divinilbenzeno (DV) na presença de oligômeros lineares porogênicos ε-caprolactona (PCL), que foram extraídos com tetrahidrofurano (THF). A polimerização ocorreu de forma fotoiniciada devido à transparência dos monômeros precursores. As redes poliméricas que agem como porogênicos na síntese (semi-IPNs) são adicionadas na solução reativa homogênea que já apresenta os monômeros precursores, formando estruturas poliméricas bifásicas. Entre os fatores que controlam a separação de fase, ou seja, que controlam a estrutura porosa, a miscibilidade polímero-polímero é o principal. Após a extração dos oligômeros porogênicos, o monolito se tornou poroso, com alto teor de glóbulos e poros interconectados, como pôde ser observado nas fotomicrografias obtidas por SEM. A área superficial média obtida para este tipo de monolito ficou ao redor de 20 m² g⁻¹, suficiente para resultar em separações eficientes de pequenas moléculas (alquilbenzenos).

Nischang e Brüggemann [109] desenvolveram colunas monolíticas macroporosas a partir de butilmetacrilato, etilenodimetacrilato, 1-propanol, 1,4butanodiol e azobisisobutironitrila na proporção 24:16:34:26:1% m/m/m/m. Estas colunas foram testadas na separação de pequenas moléculas (alquilbenzenos) usando nano-LC no modo isocrático. Os estudos de porosidade determinaram baixos valores de área superficial, todos menores que 6 m² g⁻¹ pelo método BET. Valores menores de área superficial foram obtidos quanto maior era o tempo de polimerização térmica. Os autores concluíram que o monolito desenvolvido é macroporoso e que a determinação de área de superfície dos poros é uma boa estimativa sobre a quantidade de mesoporos presentes no material, já que estes tipos de poros apresentam maior contribuição na área disponível para interação com os analitos. Além disso, a área de superfície contribui para um aumento na capacidade de picos, retenção e, consequentemente, seletividade da fase estacionária. Estes dois últimos parâmetros foram observados na separação de

moléculas pequenas mesmo com baixos valores de área superficial, concluindo que o monolito sintetizado fornece seletividade metilênica suficiente e adequada para a separação dos analitos selecionados.

Bernabé-Zafón *et al.* [76] sintetizaram colunas monolíticas à base de laurilmetacrilato por polimerização térmica a 70 °C e por polimerização sob radiação UV, em que foi investigado o tempo de exposição à luz UV. Estudou-se a influência da composição dos solventes porogênicos (1-propanol e 1,4-butanodiol) em propriedades físicas e cromatográficas. E observou-se maior permeabilidade e eficiência nas colunas polimerizadas sob influência da radiação UV. Com essas colunas foi estudada a separação de onze hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), com altura de prato de 13,4 μm.

Ou *et al.* [66] promoveram um método de rápido preparo de monolitos de poli(benzilmetacrilato-*co*-bisfenol A dimetacrilato) por meio de fotopolimerização usando cicloexanol e 1-decanol como solventes porogênicos, benzilmetacrilato como monômero funcional e bisfenol A dimetacrilato como agente de entrecruzamento. As colunas apresentaram boa permeabilidade e estabilidade mecânica, sendo que as misturas separadas foram de alquilbenzenos, PAH e compostos fenólicos. Um monolito similar, preparado com o agente de entrecruzamento etilenodimetacrilato no lugar de bisfenol A dimetacrilato, foi sintetizado para fins comparativos. O monolito preparado a partir do último agente de entrecruzamento mostrou melhor seletividade para a separação de analitos aromáticos e maior estabilidade cromatográfica em fases móveis com alto teor de água.

Yurtsever *et al.* [114] promoveram a formação de um monolito fluorinado, preparado a partir do monômero trifluoroetilmetacrilato e dos agentes porogênicos álcool isoamílico e 1,4-butanodiol. A coluna sintetizada foi avaliada por CEC. O monolito polimérico apresentou polaridade similar aos monolitos de acrilato convencionais. A avaliação do comportamento cromatográfico foi feita com a separação de alquilbenzenos e fenóis variando a força cromatográfica. O fator de retenção reduziu linearmente com o aumento no teor de acetonitrila, indicando que o mecanismo de separação foi de fase reversa. Valores de altura de prato obtidos

com o monolito fluorinado apresentaram a mesma magnitude dos de fase monolítica que carregam grupos sulfônicos fortemente ionizáveis em sua superfície.

Abbood *et al.* [115] sintetizaram monolitos de modo misto à base de hexilacrilato e utilizaram os monômeros hexilacrilato, 1,3-butanodioldiacrilato e AMPS na proporção 69,5:30,0:0,5% v/v/v. A mistura de agentes porogênicos era composta por acetonitrila, tampão fostato 5 mmol L⁻¹ pH 7,1 e etanol na proporção 60:20:20% v/v/v e a proporção entre monômeros e solventes porogênicos ficou em 1:2 v/v. O estudo da retenção cromatográfica foi feito com peptídeos estruturalmente pequenos – as enquefalinas – por nano-LC. O modo de separação por fase reversa foi avaliado com os solutos na forma neutra e a separação ocorreu por meio de interações com os sítios hidrofóbicos de hexilacrilato. Avaliou-se a influência do pH da solução tampão e sugeriu-se a presença do mecanismo de troca-catiônica devido à presença do AMPS. Este fenômeno foi avaliado pela presença de íons sódio na fase móvel durante a retenção de peptídeos.

Lin *et al.* [84] estudaram a síntese de uma fase estacionária neutra, apolar e hidrofóbica para uso em CEC a partir de octadecilmetacrilato e etilenodimetacrilato como monômeros precursores e cicloexanol e 1,4-butanodiol como solventes porogênicos, estes na proporção 30:70% v/v. Neste trabalho não foi empregado monômero carregado para evitar as interações eletrostáticas, o que, na separação de analitos básicos, pode diminuir as caudas nos picos do eletrocromatograma. Os solutos foram separados por migração eletroforética e interação hidrofóbica. As colunas sintetizadas mostraram alta eficiência na separação de analitos neutros, ácidos e básicos, sendo que a separação de solutos neutros ocorreu sob pressão. Efeitos na composição da fase móvel sobre a retenção de analitos ácidos foi investigada. E, sob condições otimizadas, os valores de eficiência obtidos para compostos neutros, ácidos e básicos foram 82000, 134000 e 150000 pratos m⁻¹, respectivamente.

Karenga e El Rassi [85] testaram colunas monolíticas à base de naftilmetacrilato. O mecanismo de retenção observado foi em fase reversa. Como

o monolito é neutro, sem cargas fixas em sua superfície, o EOF foi gerado pela adsorção de íons da fase móvel na superfície monolítica. Além de a interação soluto-fase estacionária ocorrer por interação hidrofóbica, há o estabelecimento de interações π - π , devido à natureza apolar e aromática dos ligantes naftil. Essas colunas permitiram a separação com alta resolução de analitos aromáticos e altamente hidrofóbicos, como os 16 PAH conhecidos. A retenção da mistura de analitos foi comparada com colunas à base de octadecilacrilato e foram observadas ordens de eluição diferentes, sendo que uma maior seletividade foi exibida pela coluna à base de naftilmetacrilato.

Wang *et al.* [101] avaliaram um monolito polar e neutro à base de metacrilato que estabelece interação hidrofílica com os analitos neutros ou carregados, separados por pCEC. A síntese do monolito envolveu o monômero neutro 2-hidroxietilmetacrilato e o agente de entrecruzamento polar pentaeritritoltriacrilato. As interações hidrofílicas ocorreram por causa da presença de grupos hidróxi e éster na superfície do monolito. Utilizaram-se cicloexanol e dodecanol como solventes porogênicos, e a proporção entre monômeros e solventes porogênicos foi variada. Os monolitos resultantes tiveram características diferentes de hidrofilicidade, permeabilidade de coluna e eficiência. Efeitos de pH, concentração de sal e conteúdo de solvente orgânico na fase móvel sobre a velocidade de EOF foram estudados. E obtiveram-se separações eficientes, ao redor de 140000 pratos m⁻¹, de fenóis, amidas e nucleosídeos.

Zhong e El Rassi [103] desenvolveram monolitos à base de metacrilato para fase normal, neutra e polar, por meio da presença de grupos dióis na superfície monolítica. Quatro diferentes monolitos à base de diolmetacrilato foram desenvolvidos usando glicerilmonometacrilato ou glicidilmetacrilato e um agente de entrecruzamento etilenodimetacrilato ou trimetilolpropanotrimetacrilato. O EOF foi gerado por adsorção de íons da fase móvel na superfície do monolito nos quatro diferentes monolitos. As fases sintetizadas foram avaliadas tanto em CEC nano-LC. 0 quanto em monolito gerado pela combinação entre glicerilmonometacrilato e etilenodimetacrilato mostrou melhores retenção, eficiência, velocidade de EOF e fluxo de velocidade linear em nano-LC.

Karenga e El Rassi [116] desenvolveram colunas monolíticas segmentadas com o objetivo de permitir um maior controle sobre parâmetros como retenção, seletividade e magnitude de EOF. Cada segmento apresentou um tipo de monolito. Um deles foi formado por monolito de naftilmetacrilato, responsável pelo estabelecimento de interações π - π e hidrofóbicas e o outro pelo monolito de octadecilacrilato, que estabelece interações hidrofóbicas e pode acelerar o EOF. A presença do monolito de octadecilacrilato permite separar solutos carregados devido ao alto EOF que pode ser gerado e controlado pelo comprimento deste segmento. Os PAH serviram de analitos-modelo para o estudo de seletividade e fator de retenção, já que são compostos difíceis de serem separados com alta resolução em colunas de fase estacionária constituída apenas por cadeias alquila, pois são analitos aromáticos. Assim, os autores puderam concluir que as colunas segmentadas apresentaram diferentes mecanismos de retenção e características de EOF, facilitando a otimização das separações.

Além das colunas descritas anteriormente, Karenga e El Rassi [117] desenvolveram monolitos com ligantes mistos para uso em CEC por fase reversa. As colunas monolíticas sintetizadas foram baseadas em diferentes composições dos monômeros octadecilacrilato e 2-naftilmetacrilato na presença do agente de entrecruzamento trimetilolpropanotrimetacrilato, tendo solventes como porogênicos a mistura entre cicloexanol, etilenoglicol e água. Em diferentes composições, observaram-se magnitudes diversas para EOF. No geral, uma maior quantidade do monômero octadecilacrilato levou a um aumento em EOF, o que indica que este ligante tem uma maior atração pelos íons da fase móvel que o 2naftilmetacrilato. Em termos de comportamento cromatográfico, os ligantes octadecil estabeleceram apenas interações hidrofóbicas, enquanto os ligantes de naftil foram responsáveis não só por estas interações, como também por estabelecer interações π - π , fornecendo a essas colunas monolíticas uma seletividade de separação única, que não seria alcançada com o uso dos ligantes isolados. As misturas-teste avaliadas por essas colunas sintetizadas com ligantes mistos eram compostas por PAH, alquilfenilcetonas, nitroalcanos, derivados de tolueno, alquilbenzenos, peptídeos e proteínas.

Zajickova *et al.* [62] desenvolveram monolitos de sílica funcionalizados por meio de enxerto promovido por radiação UV (*photografting*) do polímero poli(pentafluoropropil)metacrilato em uma única etapa. Após o processo de formação do monolito de sílica, sua superfície porosa foi tratada com 3-(trimetóxisililpropil)metacrilato para que fosse possível o ancoramento do polímero na superfície da sílica. O comportamento cromatográfico da fase formada foi avaliado por meio da separação de uma série homóloga de alquilbenzenos. A maior seletividade metilênica das fases sintetizadas em relação às fases de monolito de sílica funcionalizado com C18 e produzido comercialmente indicou que as novas fases são mais hidrofóbicas.

Svec, em 2010, [186] já havia citado em seu trabalho de revisão que a tendência no desenvolvimento de monolitos consiste em preparar estas fases estacionárias com maior área superficial a fim de que a seletividade de fases estacionárias para a separação de moléculas pequenas aumente. Nesse sentido, cresce o interesse no desenvolvimento de monolitos sintetizados pelo método de hiperentrecruzamento (*hypercrosslinking*).

Urban *et al.* [119,120], nesse contexto, desenvolveram dois trabalhos sintetizando monolitos com alta área superficial (cerca de 600 m² g⁻¹) por meio do método de hiperentrecruzamento. Este método consistiu na síntese do monômero precursor poli(estireno-*co*-cloreto de vinilbenzil-*co*-divinilbenzeno), que foi "inchado" com o solvente 1,2-dicloroetano e hiperentrecruzado via reação de Friedel-Crafts catalisada com cloreto de ferro III. As condições reacionais, tanto para a síntese do monômero precursor quanto para o hiperentrecruzamento, foram otimizadas por meio de um planejamento experimental. A fase estacionária hiperentrecruzada consistiu em um arranjo de pequenos poros que tornaram a coluna adequada para a separação de moléculas pequenas como uracil e alquilbenzenos, obtendo uma eficiência cromatográfica de 80000 pratos m⁻¹ em HPLC. A melhoria no formato do pico pôde ser obtida com o uso de altas temperaturas e de uma mistura ternária de solventes da fase móvel composta por acetonitrila, THF e água. Com essa última condição, foi possível separar sete compostos em menos de 2 min de análise. Como houve formação de uma rede de

poros muito pequenos, essas fases puderam ser aplicadas em cromatografia de exclusão por tamanho.

Por fim, com o objetivo de superar problemas, como a alta fragilidade com o uso de moldes capilares que sejam transparentes à radiação UV, Walsh et al. [121] desenvolveram monolitos poliméricos cuja síntese é iniciada por diodos que emitem luz (LED) na região de comprimento de onda de 660 nm, com capilares recobertos por poliimida. Os monolitos sintetizados neste trabalho foram o poli(butilmetacrilato-*co*-etilenodimetacrilato) 0 poli(metilmetacrilato-coе etilenodimetacrilato), entrecruzador por radiação UV, tendo como agentes porogênicos a acetonitrila e o 1-propanol - o preparo foi feito em capilares de sílica fundida recobertos com poliimida de vários diâmetros internos, assim como em *microchips* de poliimida. A repetibilidade, que se mostrou adequada no processo de preparo e na estrutura monolítica resultante, foi avaliada para o monolito poli(butilmetacrilato-co-etilenodimetacrilato) em capilar recoberto com poliimida de 100 µm de diâmetro interno. O comportamento cromatográfico foi investigado com a separação de uma mistura-modelo de proteínas, sendo elas ribonuclease A, citocromo C, mioglobina e ovalbumina.

Neste trabalho, fases monolíticas do tipo C18, preparadas a partir do monômero octadecilmetacrilato, foram desenvolvidas para suprir a escassez de estudos acerca do assunto – a baixa solubilidade em meio aquoso de monômeros de metacrilato de longa cadeia hidrofóbica [74,139,144,147], que muitas vezes exige a inserção de surfactantes para que seja possível a formação de uma fase líquida e homogênea para preenchimento da coluna capilar [13,94], sendo este o principal entrave para o desenvolvimento destas fases estacionárias. Além disso, a necessidade de inserção de um monômero com carga para geração de EOF na coluna capilar dificulta a solubilização do octadecilmetacrilato com este monômero hidrofílico [159]. Fases estacionárias altamente hidrofóbicas são interessantes para a separação por retenção diferenciada de analitos altamente hidrofóbicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos o desenvolvimento e a caracterização, tanto eletroforética quanto físico-química, de colunas monolíticas poliméricas a partir do monômero precursor octadecilmetacrilato. O trabalho foi realizado em duas etapas: na primeira, prepararam-se fases estacionárias a partir da variação do tipo e da proporção de solventes porogênicos e, na segunda, a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos. Nesta segunda etapa, um estudo de repetibilidade de preparo foi desenvolvido, sendo que os parâmetros avaliados foram a eficiência de separação, a área superficial, o volume de poro e o aspecto estrutural do leito monolítico ao longo de uma mesma coluna e entre colunas diferentes preparadas com mesma composição de fase estacionária.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e reagentes

Hidróxido de sódio P.A. (Agilent); água deionizada tipo Milli-Q (Millipore); 3-(trimetóxisili)propilmetacrilato (TMSPM) (Aldrich); N.N-dimetilformamida (DMF) etilenodimetacrilato (EDMA) (Aldrich); octadecilmetacrilato (ODMA) (Aldrich); (Aldrich); azobisisobutironitrila (AIBN) (Fluka); ácido 2-acriloilamido-2metilpropanossulfóxido (AMPS) (Fluka); álcool isoamílico (Grupo Química); álcool amílico (Aldrich); cicloexanol (Grupo Química); 1,4-butanodiol (Aldrich); 2-amino-2hidroximetilpropano-1,3-diol (Tris) (Fluka); etilbenzeno (Fluka); propilbenzeno (Fluka); butilbenzeno (Fluka); pentilbenzeno (Fluka); acenafteno (Aldrich); (Fluka); acenaftileno (Supelco); antraceno benzo[a]antraceno (Aldrich); benzo[b]fluoranteno (Aldrich); benzo[a]pireno (Aldrich); criseno (Aldrich); fenantreno (Carlo Erba); fluoranteno (Aldrich); fluoreno (Supelco); naftaleno (Vetec Química Fina); pireno (Aldrich); mistura de 16 PAH EPA (Environmental Protection Agency) 610-S (Supelco Analytical); o-terfenil (Merck); trifenileno (Fluka); uracil (Aldrich); tioureia (Riedel-deHaën); metanol (J. T. Baker); acetonitrila (J. T. Baker); seringas de vidro de 1, 3 e 5 mL (Arti Glass); 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); capilares de sílica fundida recobertos externamente com poliimida de 75 µm de diâmetro interno (Agilent).

3.2. Equipamentos

Forno de cromatógrafo a gás 5890A (Hewlett Packard); forno CH-150 (Eldex); bomba de HPLC LC-10AD (Shimadzu); bomba tipo seringa de microcromatografia 260D (ISCO); bomba tipo seringa KDS-100 (Kd Scientific); equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies) equipado com um computador para aquisição de dados e software ChemStation; porosímetro ASAP 2010 (Micromeritics); microscópio de varredura eletrônica JSM-6360LV (Jeol); microscópio óptico 102M (Motic); analisador elementar 2400 (Perkin-Elmer).

3.3. Pré-tratamento do capilar

Com uma seringa de vidro, o capilar foi lavado e preenchido com solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, selado com conectores de vidro e colocado no forno a 95 °C por 2 h. Em seguida, foi lavado com água deionizada filtrada do tipo Milli-Q até meio neutro e com metanol, e deixado em fluxo de nitrogênio por 1 h [74].

Após essa primeira parte do pré-tratamento, uma solução de TMSPM em DMF na proporção 1:1 v/v foi preparada para preencher o capilar, que foi novamente fechado com os conectores e colocado no forno a 100 °C por 8 h. Depois, o capilar foi lavado com DMF e água deionizada filtrada do tipo Milli-Q e, mais uma vez, deixado em fluxo de nitrogênio por 1 h [74]. Esta segunda parte do pré-tratamento pode ser representada pela reação da Figura 7.



Figura 7. Representação esquemática da reação envolvendo os grupos silanoatos da parede interna do capilar com solução de TMSPM em DMF, sob aquecimento a 100 °C.

3.4. Polimerização dos monolitos

As etapas de preparo dos capilares foram as seguintes:

a-) Primeiro, pesaram-se o agente iniciador (AIBN) e o reagente responsável por deixar a fase estacionária carregada negativamente (AMPS, monômero com carga). A cada uma das fases sintetizadas foi adicionado cerca de 8,0 mg de agente iniciador. Em seguida, colocaram-se os solventes em um frasco com tampa e, em outro, os monômeros (ODMA e EDMA), deixados sob fluxo de nitrogênio para evitar o contato com o oxigênio proveniente do ar. Posteriormente, o AMPS e o AIBN foram adicionados ao frasco dos monômeros e, por último, os solventes porogênicos. Por fim, o frasco foi fechado e colocado no ultrassom por 1 h para a homogeneização das soluções e a solubilização dos sólidos.

A reação de decomposição do reagente iniciador, AIBN, está representada na Figura 8.



Figura 8. Representação esquemática da reação de decomposição do AIBN, formando gás nitrogênio e radicais livres. Neste caso, sob aquecimento a 60 °C.

A reação de polimerização, que resulta na formação de poli(ODMA-*co*-EDMA), está representada na Figura 9.



rigura 9. Representação esquemática da reação de polimerização, sob aquecimento a 60 ºC.

Neste trabalho foram feitas as seguintes variações na mistura reacional:

1. Variação do tipo e da proporção do agente porogênico. Neste caso, a proporção utilizada entre monômeros:solventes porogênicos foi de 33:67% v/v [143]. A proporção dos monômeros precursores ODMA:EDMA 59,4:40% m/m manteve-se constante, assim como a do monômero com carga AMPS (0,6% m/m), para o preparo de todas as fases estacionárias. Na Tabela 1 estão os capilares e as diferentes variações na composição dos solventes porogênicos.

Capilar	Solventes porogênicos / % v/v						
	Álcool isoamílico	1,4-butanodiol	Água	Álcool amílico	Cicloexanol		
1	70	30	-	-	-		
2	65	35	-	-	-		
3	75	25	-	-	-		
4	75	15	10	-	-		
5	70	20	10	-	-		
6	65	25	10	-	-		
7	-	35	-	65	-		
8	-	35	-	-	65		

Tabela 1. Tipos e proporções de solventes porogênicos avaliados no preparo dos monolitos.

2. Variação dos monômeros em relação aos solventes porogênicos. Nesta etapa, manteve-se constante a proporção dos monômeros precursores ODMA:EDMA em 59,4:40,0% m/m, assim como a do monômero com carga AMPS, em 0,6% m/m. Como solventes porogênicos, foram utilizados álcool amílico:1,4-butanodiol 65:35 v/v. A Tabela 2 exibe as colunas capilares sintetizadas a partir da variação na proporção entre monômeros e agentes porogênicos.

Capilar	Monômeros : Solventes Porogênicos / % v/v					
	Monômeros	Solventes porogênicos				
G	20	80				
Н	25	75				
В	29	71				
С	31	69				
А	33	67				
D	35	65				
E	37	63				
F	40	60				

Tabela 2. Proporções de monômeros:porogênicos avaliados na polimerização dos monolitos.

b-) Após a solubilização dos monômeros com os solventes porogênicos, colocou-se a solução dentro dos capilares com uma seringa de vidro, selaram-se os capilares com os conectores de vidro e o restante foi deixado no frasco,

adequadamente tampado, para avaliar o processo de polimerização fora do capilar. Os capilares e o frasco foram colocados no forno a 60 °C por 24 h para permitir a polimerização dos monômeros.

c-) Depois da polimerização, os capilares foram lavados em bomba de HPLC com acetonitrila:água 70:30 v/v para lavar o polímero e retirar o solvente porogênico. A acetonitrila e a água foram filtradas em sistema de filtração com filtro de 0,45 μm de porosidade, e desgaseificadas em banho de ultrassom.

d-) Para fazer a janela de detecção, colocou-se papel alumínio nos limites da janela, a 8 cm da saída, e queimou-se a parte descoberta para retirar a poliimida que recobre o capilar. Em seguida, inseriu-se o capilar numa caixa de madeira fechada contendo uma lâmpada de UV de 125 watts de potência, acima da região da janela de detecção (a porção queimada do capilar). A coluna capilar ficou na caixa de UV por cerca de 10 h. Esse procedimento foi necessário para fazer a despolimerização do monolito na região da janela de detecção. Para observar que o processo de despolimerização havia terminado, o capilar foi retirado da caixa e avaliado com a ajuda de um microscópio óptico. Este procedimento de despolimerização sob radiação UV foi feito apenas nos capilares preparados com variação no tipo e na proporção de solventes porogênicos. Para os demais, notouse que não havia necessidade desta etapa, já que a queima promovida com o uso do isqueiro proporcionou a remoção da poliimida e a decomposição do material polimérico existente na região da janela, que ficou transparente à radiação UV.

e-) Após esse procedimento, lavou-se o capilar com o auxílio de uma bomba de cromatografia líquida, com solução de eletrólito tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v por cerca de 70 a 100 h para posterior uso no equipamento. Quando o uso não era imediato, lavava-se o capilar com fase móvel acetonitrila:água 70:30 v/v por 2 h, a fim de remover fragmentos da decomposição do polímero na região da janela.

3.5. Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

O preenchimento de monolito ao longo da coluna capilar foi avaliado com o auxílio do microscópio óptico. Quando o leito cromatográfico não ficava homogêneo, a coluna era, então, descartada. A morfologia e a estrutura dos poros do monolito formado no interior da coluna capilar foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Todos os capilares foram avaliados por essas duas técnicas.

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, as extremidades do capilar foram cortadas e fixadas a um porta-amostra do tipo fratura, por meio de uma fita dupla-face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro e, então, bombardeou-se o metal com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s para a formação de uma camada de, aproximadamente, 10 nm de espessura. As fotomicrografias do material monolítico foram obtidas com vários aumentos, de acordo com a melhor visualização da morfologia da fase estacionária.

3.6. Porosimetria

Os parâmetros de poros dos monolitos foram determinados por meio de um porosímetro ASAP 2010 (Micromeritics).

As amostras de fase estacionária deveriam estar completamente secas para que pudessem ser analisadas por porosimetria. Duas formas para a remoção do excesso de solventes porogênicos foram testadas. Na primeira, o material monolítico foi lavado com aproximadamente 100 mL de metanol por 6 a 10 vezes e, posteriormente, aquecido em forno a 80 °C por 24 h. Entretanto, esse procedimento não eliminou totalmente os resíduos de solventes gerados durante a polimerização. O segundo procedimento consistiu na extração sólido-líquido, empregando Soxhlet por 24 h e metanol como solvente de extração, com posterior aquecimento em forno a 80 °C por 15 h. Com este procedimento, todas as fases sintetizadas se apresentaram como um pó fino completamente seco e livre de solventes. Desse modo, as amostras puderam ser submetidas à análise porosimétrica. O método utilizado para a obtenção dos parâmetros estruturais foi a adsorção e dessorção de nitrogênio, gerando isotermas que foram medidas a -196 °C. Antes de fazer as medições, as amostras foram submetidas à desgaseificação por 4 h a 150 °C sob um vácuo de 15 mPa. As análises das isotermas incluíram a avaliação da área de superfície específica de acordo com o método BET (Brunauer, Emmet e Teller) [162], a partir dos dados de adsorção na faixa de pressão relativa (p/p₀) de 0,06 a 0,25, em que p₀ e p denotam as pressões de saturação e o equilíbrio do nitrogênio a -196 °C, respectivamente. O volume de poro total foi avaliado usando o método do ponto único [162], pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p₀ de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O método BJH (Barret, Joyner e Hallenda) foi usado para avaliar a distribuição do tamanho dos poros do material monolítico.

3.7. Análise elementar

Para as colunas sintetizadas a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos foram determinadas as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio, que compunham essas fases estacionárias. O método utilizou a combustão para converter carbono em gás carbônico, que é medido em função de sua condutividade térmica.

3.8. Preparo do eletrólito de corrida e amostras

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de tampão Tris na concentração 100 mmol L⁻¹. A partir dela, fez-se uma diluição para atingir a concentração de 25 mmol L⁻¹, cujo pH, em torno de 10,0, foi ajustado para 8,0 por meio da adição gradativa de HCl 1 mol L⁻¹. O pH foi ajustado em um pHmetro calibrado na faixa de pH entre 7,0 e 9,0.

A solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ era armazenada em baixas temperaturas na geladeira e diariamente desgaseificada antes do uso. Essa solução era adicionada ao frasco de amostra de acordo com a proporção da solução de

eletrólito tampão Tris:acetonitrila. Por exemplo: quando a fase móvel era tampão Tris:acetonitrila 30:70 v/v, adicionava-se 150 μ L de tampão e 350 μ L de acetonitrila.

A mistura teste era composta por benzenos – etilbenzeno (530 μ g mL⁻¹), propilbenzeno (600 μ g mL⁻¹), butilbenzeno (670 μ g mL⁻¹) e pentilbenzeno (740 μ g mL⁻¹) –, e por um composto marcador, a tioureia (380 μ g mL⁻¹). Uma solução estoque da mistura de benzenos na concentração de 11 mg mL⁻¹ para etilbenzeno, 12 mg mL⁻¹ para propilbenzeno, 13 mg mL⁻¹ para butilbenzeno e 15 mg mL⁻¹ para pentilbenzeno foi feita em acetonitrila, o mesmo solvente utilizado para diluir a mistura teste. A concentração da solução estoque de tioureia em acetonitrila era de 8 mg mL⁻¹. O tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 foi adicionado na devida proporção (correspondendo a 30% v/v) diretamente no frasco de amostra.

Duas outras misturas teste foram usadas na avaliação das colunas monolíticas, preparadas a partir da variação da natureza e da proporção dos solventes porogênicos: uma composta por alquilparabenos e a outra, por PAH, e ambas preparadas em acetonitrila.

A mistura de alquilparabenos foi injetada na concentração de 1500 µg mL⁻¹. Usou-se tioureia como marcador de EOF na concentração de 500 µg mL⁻¹. Essas soluções foram diluídas a partir de uma solução estoque de 1000 mg mL⁻¹ dos parabenos dissolvidos em acetonitrila.

A partir de uma solução estoque de 10000 μ g mL⁻¹ para naftaleno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno e pireno, 2000 μ g mL⁻¹ para acenaftileno, antraceno, benzo[b]fluoranteno e fluoreno, 1000 μ g mL⁻¹ para criseno e benzo[a]pireno e 600 μ g mL⁻¹ para benzo[a]antraceno, a amostra de PAH foi diluída para sua introdução nos capilares. A tioureia também foi usada como marcador de EOF na concentração de 380 μ g mL⁻¹. Na solução diluída, os analitos se apresentaram nas seguintes concentrações: 500 μ g mL⁻¹ para naftaleno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno e pireno, 300 μ g mL⁻¹ para acenaftileno, fluoreno e benzo[b]fluoranteno, 150 μ g mL⁻¹ para criseno e benzo[a]pireno, 100 μ g mL⁻¹ para antraceno e 90 μ g mL⁻¹ para benzo[a]antraceno.

Para as colunas monolíticas preparadas a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos, a mistura teste de PAH teve outros valores de concentração. O criseno não foi usado nessa etapa devido à falta de sólido suficiente para o preparo da solução estoque. Para cada padrão, uma solução estoque foi preparada com as seguintes concentrações: 10000 µg mL⁻¹ para naftaleno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno e pireno, 2000 µg mL⁻¹ para acenaftileno, fluoreno, antraceno e benzo[a]antraceno, 500 µg mL⁻¹ para benzo[a]pireno e 140 µg mL⁻¹ para benzo[b]fluoranteno. Usou-se, também, a tioureia como marcador de EOF, na concentração de 380 µg mL⁻¹. Ao serem diluídos no frasco da amostra, os analitos estavam nas seguintes concentrações: 300 µg mL⁻¹ para naftaleno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno, fluoranteno e pireno, 160 µg mL⁻¹ para benzo[a]pireno e 28 µg mL⁻¹ para benzo[b]fluoranteno.

Ainda nessa etapa do trabalho, utilizou-se uma mistura teste comercial composta por 16 PAH em metanol:diclorometano 1:1 v/v armazenados em ampola de vidro. Esta mistura apresentava os analitos nas seguintes concentrações: 2000 µg mL⁻¹ para acenaftileno, 1000 µg mL⁻¹ para naftaleno e acenafteno, 200 µg mL⁻¹ fluoreno, para benzo[b]fluoranteno, fluoranteno, benzo(q,h,i)perileno е mL^{-1} dibenzo[a,h]antraceno, 100 indeno(1,2,3-CD)pireno, μq para benzo[a]antraceno, antraceno, fenantreno, benzo[k]fluoranteno, pireno, criseno e benzo[a]pireno. A tioureia foi introduzida na solução na concentração de 380 µg mL⁻¹.

A separação dos analitos uracil (marcador de EOF), *o*-terfenil, pentilbenzeno e trifenileno foi realizada preparando-se uma solução estoque nas concentrações 107 mg L⁻¹, 313 mg L⁻¹, 15 g L⁻¹ e 320 mg L⁻¹, respectivamente. Para a injeção, os padrões foram diluídos em acetonitrila – o mesmo solvente da solução estoque –, na concentração de 32 mg L⁻¹ para uracil e trifenileno, 78 mg L⁻¹ para *o*-terfenil e 5 g L⁻¹ para pentilbenzeno.

3.9. Condicionamento e avaliação eletroforética dos capilares

Antes de a avaliação eletroforética das fases estacionárias ser feita, todas as soluções utilizadas durante a corrida eletroforética (eletrólito e solução amostra) foram colocadas em banho de ultrassom por 30 min, a fim de que ocorresse a desgaseificação.

O capilar, antes de ser testado, foi condicionado na bomba de HPLC com eletrólito constituído por solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v, até a obtenção da linha de base estável.

Em seguida, o capilar foi adaptado no cassete, inserido no equipamento e gradativamente condicionado ao aumento do potencial elétrico, sem pressão. Inicialmente, o capilar foi condicionado com aplicação de potencial de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 kV, com 15 min em cada etapa. Segundo Altria *et al.* [5], a coluna deve ser equilibrada antes da análise com gradiente de potencial até que haja corrente elétrica estável no sistema. A injeção foi eletrocinética, de 10 kV, e durou 5 s. A detecção ocorreu no comprimento de onda de 220 nm para alquilbenzenos, 228 nm para mistura com padrões de PAH e 254 nm para alquilparabenos e para a mistura de uracil, *o*-terfenil, pentilbenzeno e trifenileno. A mistura comercial de PAH foi avaliada em 254 nm, comprimento de onda sugerido no certificado de análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Colunas preparadas variando-se o tipo e a proporção de solventes porogênicos

4.1.1. Caracterização eletroforética das colunas

Antes de o álcool isoamílico ser escolhido como um dos solventes porogênicos da mistura de polimerização, testes com outros solventes citados na literatura para a síntese de colunas monolíticas orgânicas foram realizados, com o objetivo de verificar suas respectivas capacidades de solubilidade com relação aos monômeros utilizados neste trabalho. Nos testes com isopropanol, acetonitrila, etilenoglicol, dodecanol e álcool isoamílico, em várias proporções e composições, chegou-se à conclusão de que o último foi o que mais bem se solubilizou no meio. É por isso que, em um primeiro momento, as colunas capilares foram preparadas utilizando-se álcool isoamílico como componente dos agentes porogênicos.

Para cada uma das colunas capilares, calculou-se o fator de retenção (*k*), a altura de prato (*H*) e a eficiência (*N*), que corresponde ao número de pratos que uma coluna apresenta. De acordo com Huo *et al.* [140], eficiências para colunas monolíticas à base de metacrilato são calculadas, na maioria dos trabalhos, com foco no analito não retido, marcador de EOF, que gera picos estreitos e altos. Por isso, essas colunas sempre apresentam altas eficiências e alturas de prato mínimas. Neste trabalho, a eficiência foi calculada com base no composto mais retido (pentilbenzeno), de acordo com os cálculos tradicionais de eficiência para colunas testadas por HPLC. Em outras palavras, a eficiência e, portanto, o alargamento de bandas não depende apenas da hidrofobicidade, mas também do tipo e da funcionalidade dos solutos. A Tabela 3 mostra os valores que estes parâmetros assumem para cada uma das colunas, sendo L o comprimento efetivo da coluna, ou seja, a distância entre a extremidade inicial do capilar e a janela de detecção. São exibidas, também, as pressões apresentadas pelas colunas

durante o condicionamento na bomba de HPLC e o tempo total de análise para cada coluna.

Capilar	Álcool*:1,4- butanodiol:Água / % v/v	<i>N</i> ** / pratos	<i>N/L_{ef} /</i> pratos m ⁻¹	RSD*** / %	Η / μm	k**	L _{ef} / cm	Tempo de análise / min	Pressão máxima / bar
3	75:25:0	8000	11600	9	87	4,0	67,5	50,0	50
1	70:30:0	6000	18320	14	55	3,6	32,2	25,0	60
2	65:35:0	18000	25600	8	39	3,6	70,0	45,0	100
4	75:15:10	3000	10400	4	96	3,1	32,0	12,0	23
5	70:20:10	7000	21800	11	46	3,9	33,0	17,0	30
6	60:30:10	-	-	-	-	-	35,5	-	230
7	65:35:0	15000	26000	12	38	3,6	55,5	60,0	30
8	65:35:0	6000	17500	2	57	1,9	35,5	12,0	40

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se o tipo e a proporção dos solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

* colunas 3, 1, 2, 4, 5 e 6: álcool isoamílico; coluna 7: álcool amílico e coluna 8: cicloexanol.

** calculado para o pentilbenzeno.

*** estimativa do desvio padrão relativo.

Os comprimentos efetivos são diferentes para todas as colunas capilares preparadas neste trabalho, devido à quebra a que todas eram sujeitas durante as etapas de síntese das fases estacionárias, de condicionamento e de avaliação eletroforética.

Também foi calculada a mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{eo}) para cada coluna capilar ao conhecer o comprimento efetivo de cada coluna (L_{ef}), o tempo de migração da tioureia (t_{eo}) e o campo elétrico (E), que corresponde à razão entre o potencial de corrida (30000 V) e o comprimento total da coluna capilar ((L_{ef} + 8,0) cm), sendo que 8,0 cm é a distância da janela de detecção até a extremidade final do capilar. A equação 7 mostra a fórmula para o cálculo da velocidade do fluxo eletrosmótico (v_{eo}) na prática e a equação 8, a fórmula para o cálculo da

$$v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}}$$
(Equação 7)

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E}$$
(Equação 8)

A Tabela 4 apresenta os parâmetros eletroforéticos, isto é, os valores de campo elétrico, velocidade e mobilidade do fluxo eletrosmótico para cada coluna, que também pode ser considerado uma propriedade cromatográfica no caso de CEC, segundo Eeltink *et al.* [141].

proporção dos solventes porogenicos.						
	Álcool*:1,4-	Campo	Velocidade do	Mobilidade do		
Capilar	butanodiol:Água	elétrico (E)	EOF (v_{eo}) / cm	EOF (μ _{eo}) / 10 ⁻³		
-	(%)	/ V cm ⁻¹	min ⁻¹	cm ² V ⁻¹ min ⁻¹		
3	75:25:0	395	$7,42 \pm 0,04$	18,76 ± 0,09		
1	70:30:0	730	$6,5 \pm 0,2$	8,9 ± 0,2		
2	65:35:0	338	5,5 ± 0,1	16,3 ± 0,3		
4	75:15:10	750	11,8 ± 0,2	15,8 ± 0,2		
5	70:20:10	714	$9,8 \pm 0,4$	13,8 ± 0,5		
6	60:30:10	-	-	-		
7	65:35:0	472	4,4 ± 0,1	$9,3 \pm 0,3$		
8	65:35:0	690	9,54 ± 0,01	13,83 ± 0,01		

Tabela 4. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se o tipo e a proporção dos solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

* colunas 3, 1, 2, 4, 5 e 6: álcool isoamílico; coluna 7: álcool amílico e coluna 8: cicloexanol.

Os valores para velocidade e mobilidade do EOF não seguiram um aumento ou uma redução com a variação dos solventes porogênicos, pois, como será discutido posteriormente, o EOF depende da homogeneidade da estrutura monolítica ao longo do leito da coluna.

Todos os eletrocromatogramas – cada um para uma coluna capilar – foram obtidos em triplicata. Os analitos separados foram alquilbenzenos, cujas fórmulas estruturais aparecem na Figura 10. As Figuras 11 a 17, a seguir, mostram os eletrocromatogramas obtidos com a mistura teste de alquilbenzenos para cada um dos diferentes capilares.



Figura 10. Fórmulas estruturais dos analitos. 1. Etilbenzeno; 2. Propilbenzeno; 3. Butilbenzeno; 4. Pentilbenzeno.



Figura 11. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 3 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 12. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 13. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 14. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 4 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 15. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 5 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 16. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 7 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 17. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar 8 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.

Entre as fases estacionárias sintetizadas com álcool isoamílico (1 a 6), a coluna que apresentou maior eficiência foi a 2, com 25600 pratos m⁻¹, preparada com a proporção 65:35 v/v álcool isoamílico:1,4-butanodiol sem água na composição dos solventes porogênicos. Ao se analisar a Tabela 3, observa-se que o aumento na proporção de 1,4-butanodiol em relação ao álcool isoamílico provoca maior eficiência de separação na coluna. Seguindo esse raciocínio, supõe-se que a proporção 60:40 v/v álcool isoamílico:1,4-butanodiol poderia aumentar o número de pratos da coluna. Entretanto, duas colunas com esta composição foram preparadas, mas não houve polimerização adequada da fase em nenhuma das tentativas.

A água foi adicionada na composição dos solventes porogênicos, pois muitos artigos na literatura [44,60,67,90,91,94,97,107] citam seu uso na mistura de síntese. Como mostra a Tabela 3, para os capilares contendo água na composição dos solventes porogênicos, também notou-se um aumento em eficiência conforme se alterou o teor de 1,4-butanodiol de 15% para 20%. Porém, quando se aumentou o teor deste reagente para 30%, não foi possível a avaliação

eletroforética da coluna, que caracterizou-se como pouco permeável, haja visto o alto valor de pressão máxima de lavagem alcançado.

A partir dos resultados obtidos com o álcool isoamílico, foram preparadas colunas usando um isômero deste solvente, o álcool amílico (1-pentanol), e o cicloexanol, empregado para tal função por um grande número de autores [11,69,72,80,84,91,101,102,107,116,117,125,130,131,187] que trabalham com monolitos poliméricos de cadeias longas. A proporção entre esses solventes e 1,4-butanodiol foi a mesma daquela obtida para a coluna mais eficiente preparada com o álcool isoamílico. O capilar 7 foi, então, preparado com o álcool amílico e o capilar 8, com o cicloexanol. A eficiência obtida para a coluna 7 (26000 pratos m⁻¹) foi similar àquela da coluna 2 (25600 pratos m⁻¹). Já para a coluna 8 alcançou-se um valor de eficiência menor que o das colunas 2 e 7.

A corrente elétrica durante a corrida cromatográfica dos capilares 1 a 8 oscilou entre os valores de 7 μ A e 17 μ A.

4.1.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias

Segundo Kimata *et al.* [188], o caráter hidrofóbico de uma fase estacionária pode ser descrito pela seletividade metilênica ou hidrofóbica – relativa aos grupos metilas pertencentes à fase –, já que tais grupos contribuem minimamente com fatores estéricos. As características hidrofóbicas da fase estacionária permitem a separação de compostos com diferentes graus de hidrofobicidade, podendo separar, assim, hidrocarbonetos com estruturas químicas semelhantes, como é o caso dos PAH, que foram separados com as fases monolíticas desenvolvidas neste trabalho.

Kimata *et al.* [188] e Engelhardt e Jungheim [189] sugeriram o uso da seletividade metilênica como forma de analisar a hidrofobicidade de uma fase estacionária. Segundo Deyl e Svec [38], a hidrofobicidade determina a seletividade da separação e é um parâmetro que pode ser usado para avaliar a repetibilidade de síntese das fases estacionárias.

Com o fim de avaliar parâmetros cromatográficos entre diferentes fases e, assim, também, a hidrofobicidade, misturas teste são, geralmente, empregadas. Elas devem ser compostas por solutos de fácil obtenção em qualquer laboratório analítico e estar sempre sob as mesmas condições de teste, para que seja possível estabelecer comparações entre fases estacionárias diferentes.

Para CEC, utiliza-se, normalmente, uma série homóloga de alquilbenzenos, em que o benzeno com menor cadeia pode ter apenas um carbono ou, às vezes, nenhum, consistindo apenas em uma molécula de benzeno. De acordo com Moravcová *et al.* [134], obtém-se a determinação da seletividade aromática da fase estacionária quando a seletividade é calculada para o benzeno. Neste trabalho, o composto não foi usado como analito na mistura de alquilbenzenos e, desse modo, a seletividade aromática da fase monolítica não pôde ser determinada.

O cálculo de seletividade metilênica é feita da mesma forma para CEC por muitos grupos de pesquisa [151,50,62,66,71,105,133,134,136]. A equação 9 mostra como a seletividade hidrofóbica de uma fase estacionária pode ser determinada.

$$log k = n_c log \alpha + log \beta$$
 (Equação 9)

Na equação 9, k é o fator de retenção, n_c é o número de carbonos de cada alquilbenzeno, α é a seletividade metilênica e β é o fator de retenção para benzeno, ou seja, é k quando $n_c = 0$.

O eixo das ordenadas é ocupado pelo log k e o eixo das abscissas pelo n_c , e a inclinação da curva é o log α . Um bom valor de linearidade, maior que 0,99, indica que a equação 9 pode ser usada para monolitos e que estes apresentam seletividade adequada para analitos apolares, que diferem entre si por uma unidade de grupo metilênico.

Para cada fase estacionária, foi determinada log α , o valor de α e o coeficiente de correlação para a relação linear. Esses parâmetros se reúnem na Tabela 5.
Capilar	Álcool*:1,4- butanodiol:Água (%)	$\log \alpha$	α	Coeficiente de determinação
3	75:25:0	0,1080	1,2823	0,9964
1	70:30:0	0,1028	1,2670	0,9966
2	65:35:0	0,1051	1,2736	0,9960
4	75:15:10	0,0990	1,2559	0,9960
5	70:20:10	0,1083	1,2832	0,9968
6	60:30:10	-	-	-
7	65:35:0	0,1039	1,2703	0,9960
8	65:35:0	0,0766	1,1928	0,9944

Tabela 5. Seletividade metilênica das colunas preparadas variando-se o tipo e a proporção dos solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

* colunas 3, 1, 2, 4, 5 e 6: álcool isoamílico; coluna 7: álcool amílico e coluna 8: cicloexanol.

Todas as curvas obtidas para as fases estacionárias apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,99 e se mostraram, assim, seletivas para a separação de analitos apolares aromáticos, como os alquilbenzenos. Além disso, as curvas mostraram que o fator de retenção aumentou linearmente conforme o número de carbonos do analito. Esta observação não surpreende em se tratando de fases monolíticas de caráter apolar envolvidas na separação de analitos apolares com diferença de um grupo metilênico, já que quanto maior o número de metilas, maior a retenção.

A seletividade metilênica calculada para as fases sintetizadas com álcool isoamílico e amílico (1 a 7) se revelou constante, em torno de 1,3. A fase sintetizada com cicloexanol, por sua vez, apresentou uma seletividade pouco menor, com valor de 1,2. Essa diferença indica que a fase monolítica 8 tem hidrofobicidade levemente menor que a das fases de 1 a 7.

Como o conteúdo de monômero precursor (ODMA), responsável por fornecer o caráter altamente apolar à fase, se manteve constante em todas as misturas de polimerização, não se esperava uma grande variação na seletividade metilênica das fases estacionárias, mesmo tendo sido preparadas a partir da mudança do tipo e da proporção de solventes porogênicos.

Ao se comparar os resultados obtidos com os do trabalho de Moravcová *et al.* [134], percebe-se uma semelhança de valores para a seletividade metilênica calculados para colunas de polimetacrilato, à base de butilmetacrilato e preparadas com EDMA como entrecruzador, 1-propanol e 1,4-butanodiol como agentes porogênicos. Os valores para esse monolito, sintetizado em várias condições experimentais da mistura de polimerização (diversas proporções entre monômeros e solventes porogênicos), se encontraram ao redor de 1,3. Todos são menores que os valores de α para colunas recheadas por partículas do tipo C18, por volta de 1,5, o que permite afirmar que a hidrofobicidade das fases monolíticas C4 de Moravcová *et al.* e as de C18, constatada neste trabalho, é menor que àquela apresentada por colunas particuladas apolares no trabalho de Moravcová *et al.* [134].

4.1.2. Caracterização físico-química

4.1.2.1. Porosimetria

A melhor maneira encontrada para avaliar a estrutura dos poros das fases estacionárias foi por meio do preparo dos diferentes monolitos simultaneamente, em um único dia, para que as condições de síntese e de ambiente fossem as mesmas. Entretanto, com este procedimento, não foi possível o preenchimento de todas as colunas em um único dia. Desse modo, apenas o material contido nos frascos de preparo foi analisado e seus parâmetros de poros foram comparados com os capilares sintetizados anteriormente, com a mesma composição de fase estacionária. Este processo pode ser chamado de fabricação *ex situ.* A caracterização de monolitos dessa maneira – produzidos independentemente da amostra avaliada – foi realizada por outros grupos de trabalho, como de Shkolnikov *et al.* [56].

A Tabela 6 mostra os valores para a área superficial e o volume de poro para cada fase estacionária, além dos de eficiência cromatográfica para a coluna

capilar com a mesma composição do monolito. O número das fases estacionárias se refere ao capilar sintetizado, em outro momento, mas de mesma composição.

Fase	Eficiência das colunas de mesma	Solver	ites Porogên % v/v	Área superficial	Volume de poro /	
estacionária	composição / pratos m ⁻¹	Álcool	1,4- butanodiol	Água	$/ m^2 g^{-1}$	10 ^{-s} cm ^s g ⁻¹
2 [*]	25600	65	35	-	2,53	3,63
1 [*]	18320	70	30	-	1,86	2,62
3*	11600	75	25	-	1,53	2,19
6 [*]		60	30	10	5,34	10,73
5 [*]	21800	70	20	10	2,70	4,22
4*	10400	75	15	10	1,90	2,45
7**	26000	65	35	-	2,74	3,99
8***	17500	65	35	-	4,31	7,99

Tabela 6. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico em que se variaram o tipo e a proporção dos solventes porogênicos.

Obs.: --: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

O álcool utilizado foi o álcool isoamílico.

** O álcool utilizado foi o álcool amílico.

** O álcool utilizado foi o cicloexanol.

Em um primeiro momento, notou-se que, de forma geral, quanto maior o volume do poro, maior era sua área superficial. E que o volume dos poros pode ser controlado apenas por meio da variação na proporção e na natureza dos solventes porogênicos (álcool isoamílico, amílico ou cicloexanol, 1,4-butanodiol e água).

Segundo Peters *et al.* [86], altos valores de área superficial e um consequente grande volume de poro implicam em mais altos valores de eficiência cromatográfica, isto é, em maior número de pratos, pois também maiores são a área de fase estacionária com que o analito pode interagir e o número de equilíbrios que ocorrem ao longo da coluna. Essa correlação foi observada, ainda, com o octadecilmetacrilato como monômero precursor dos monolitos, já que a grande maioria das fases estacionárias com maiores valores de área superficial apresentaram os maiores valores de eficiência cromatográfica.

Em relação aos solventes porogênicos, percebeu-se que os valores de área superficial obtidos foram maiores quanto maior era a proporção de 1,4-butanodiol

na composição dos agentes porogênicos – por apresentar tamanho de cadeia menor em relação ao álcool isoamílico [6,65], este reagente é o responsável pela formação de micro e mesoporos. Assim, com o aumento do teor de 1,4-butanodiol para colunas preparadas tanto na ausência de água quanto na presença dela, os domínios do material monolítico se tornam menores, com maior quantidade de micro e mesoporos e, consequentemente, maiores áreas superficiais. Na presença de água, a coluna 6 apresentou maior valor de área superficial em relação às colunas com menor teor de 1,4-butanodiol, como era esperado. O alto valor de área superficial, destoante do valor de área para as demais colunas preparadas com álcool isoamílico, sugere grande quantidade de micro e mesoporos no material. A suposição foi confirmada com as fotomicrografias obtidas posteriormente por SEM, e esta grande quantidade de micro e mesoporos afetou a permeabilidade da coluna, comprometeu sua avaliação eletrocromatográfica e resultou em baixa eficiência de separação, ou melhor, impossibilidade de análise neste caso.

De acordo com Eeltink *et al.* [126], além de o solvente 1,4-butanodiol possuir cadeia menor que os demais álcoois utilizados para compor os agentes porogênicos, o fato de o polímero sintetizado ser baseado em cadeias com dezoito carbonos também é um parâmetro importante para a classificação do solvente quanto à característica porogênica. Moléculas poliméricas preparadas a partir de unidades monoméricas com cadeias altamente hidrofóbicas tendem a se aglomerar em grande extensão em ambiente relativamente polar, formando muitos glóbulos de menor tamanho. Essa aglomeração resulta de interações hidrofóbicas entre núcleos formados durante a separação de fase. Por isso, quanto maior a proporção de 1,4-butanodiol (solvente responsável por tornar o ambiente polar), os glóbulos se agregam mais e se formam pequenos glóbulos, o que caracteriza uma estrutura porosa dotada de maior homogeneidade [135].

Os baixos valores encontrados para a área superficial, sempre menor que $6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, também são similares aos citados na literatura para fases estacionárias de monolitos poliméricos à base de metacrilato de cadeias longas [27,52,71,86,118,147].

Para todas as fases estacionárias sintetizadas, as isotermas de adsorçãodessorção de nitrogênio se mostraram muito semelhantes e, segundo a classificação BDDT [180], podem ser consideradas isotermas do tipo IV devido à pequena histerese observada na dessorção. As isotermas obtidas para as fases estacionárias 3, 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 aparecem nas Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25.



Figura 18. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 3.



Figura 19. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 1.



Figura 20. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 2.



Figura 21. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 4.



Figura 22. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 5.



Figura 23. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 6.



Figura 24. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 7.



Figura 25. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária 8.

Em baixas pressões, o volume de gás adsorvido aumenta linearmente, formando uma reta quase vertical até determinada pressão. Esse aumento é causado pela presença de microporos no material monolítico, em que a adsorção do gás ocorre mais facilmente [169], pois as paredes do poro são muito próximas, o que intensifica as interações adsorvente-adsorbato [163]. Após essa etapa de preenchimento gradual de microporos com adsorbato, que ocorre em ordem crescente de tamanho, a adsorção prossegue até que todos os poros sejam preenchidos com o gás e formem uma região planar (adsorção constante), já que não há nenhuma outra em que a adsorção aconteça de forma significativa [167]. A curva volta a crescer depois dessa etapa de adsorção constante por causa do fenômeno de condensação do gás.

Nas isotermas das fases analisadas, a histerese é muito fechada ou, algumas vezes, imperceptível na região próxima à saturação. Esse formato revela que o sólido adsorvente apresenta restrita faixa de tamanho de mesoporos [180], o que é confirmado pela observação posterior das curvas de distribuição de poros. A histerese pode ser visualizada na região de baixa pressão relativa, o que indica que o sistema mostra microporos, segundo Sing *et al.* [163]. Em pressões relativas

ainda menores, uma torção acentuada foi observada devido ao alto potencial de adsorção dos microporos, conforme explicam Bereznitski *et al.* [171].

Quando as isotermas das fases sintetizadas são analisadas, observa-se, também, que todas são muito semelhantes e se diferenciam entre si apenas pela quantidade de gás adsorvido na faixa de pressão relativa estabelecida. De acordo com Jaroniec *et al.* [174], quando os perfis gerais dos ramos da adsorção e da dessorção são similares, a estrutura porosa entre as diversas fases estacionárias é essencialmente muito parecida. O parâmetro que as diferencia é a quantidade de poros formados em cada uma delas, o que pode ser considerado lógico já que a modificação se dá em termos de variação de tipo e de proporção de solventes porogênicos, responsáveis pela formação dos poros e, portanto, controladores de seu tamanho e quantidade.

O crescimento das isotermas na região próxima de $p/p_0 = 1$ é essencialmente vertical e não se torna horizontal no final do processo. Isso indica a presença, no material monolítico, de grande quantidade de macroporos que, não sendo completamente preenchidos, não permitem ao volume de gás adsorvido manter-se constante no final do processo de adsorção [163,170]. Comparando as isotermas, ao se reduzir a quantidade de 1,4-butanodiol na ausência ou na presença de água, nota-se uma diminuição na quantidade de gás adsorvido em determinada pressão relativa, o que pode ser justificado pela redução na quantidade de mesoporos no material – conclusão, aliás, já obtida pela análise dos resultados porosimétricos.

Por meio da análise das isotermas, infere-se que o material monolítico pode apresentar três tipos de poros: micro, meso e macroporos.

As curvas de distribuição de poros foram obtidas pelo método BJH na etapa de dessorção de nitrogênio. As Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 mostram as curvas de distribuição de tamanho de poros para as fases estacionárias 3, 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8.



Figura 26. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 3.



Figura 27. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 1.



Figura 28. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 2.



Figura 29. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 4.



Figura 30. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 5.



Figura 31. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 6.



Figura 32. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 7.



Figura 33. Curva de distribuição de poros da fase estacionária 8.

Para analisar as curvas obtidas, foi estudada a interpretação de curvas de distribuição de poros realizada por alguns grupos de pesquisa, como o de Nakanishi *et al.* [190]. No trabalho desenvolvido por este grupo de pesquisa, as curvas apresentaram perfil semelhante ao obtido com o material monolítico neste estudo e foram interpretadas de acordo com o valor de volume de gás adsorvido que consta no eixo das ordenadas. Assim, curvas que alcançam valores maiores de volume de poro indicam que estas têm um maior tamanho de poro, afinal mais gás foi necessário para preencher os poros do material em uma mesma pressão relativa. No trabalho de Santora *et al.* [124], a mesma interpretação foi realizada para a compreensão das curvas de distribuição de tamanho de poros. Nas curvas das figuras anteriores, observa-se a distribuição de mesoporos com diâmetro entre 2 e 50 nm. Em outras palavras, determina-se a fração de poros com determinado tamanho na região dos mesoporos [191], já que não é possível classificar os poros por tamanho por meio de visualização de micrografias obtidas por SEM, que mostram apenas a estrutura macroporosa do material monolítico [38,182].

Ao analisar essas curvas, nota-se que o material monolítico é mesoporoso e que os mesoporos são pequenos, com tamanho predominante na faixa de 2 a 15 nm. Concentram-se, desse modo, no limite inferior da faixa de tamanho de mesoporos – o que também indica a microporosidade do material – e têm sua quantidade variável de acordo com a mudança na proporção dos solventes porogênicos. Para as fases estacionárias sintetizadas na ausência de água, percebe-se, na ordem 3, 1 e 2, um aumento na quantidade de mesoporos conforme de 1,4-butanodiol, aumenta a proporção agente micro е mesoporogênico, o que é coerente com o aumento no valor de área superficial de poro obtida pela técnica BET. A mesma conclusão é observada para as fases estacionárias preparadas na presença de água, ou seja, na ordem 4, 5 e 6, em que se nota um aumento na quantidade de mesoporos (como já concluído pela elevação no valor de área superficial de poro nesta mesma ordem). A observação do volume de gás adsorvido nas isotermas referentes a estas fases também concorda com o aumento dos mesoporos conforme há maior quantidade de 1,4butanodiol, pois há crescimento do volume de gás adsorvido nesta ordem.

O perfil da curva de distribuição de poro referente ao capilar 7 se mostrou similar àquele apresentado pelo capilar 2, do que se deduz que as duas fases apresentam quantidades similares de poros de mesmo tamanho. Tal conclusão está em concordância com o fato de essas fases terem a mesma proporção de solventes porogênicos e as maiores eficiências de separação, em torno de 26000 pratos m⁻¹.

A presença de microporos na estrutura, constatada pelo perfil das isotermas obtidas, pôde ser confirmado pelo método *t-plot* [162,180]. Para as fases estacionárias sintetizadas, as t-curvas são muito semelhantes e todas ratificaram a presença de microporos na estrutura do material monolítico por meio da observação do desvio da curva na região de baixos valores de t, fato também ocorrido no trabalho de Sonwane e Ludovice [172].

4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias obtidas para as colunas capilares sintetizadas variando-se o tipo e a proporção dos agentes porogênicos confirmaram a formação do material monolítico no interior do capilar, bem como seu ancoramento na parede interna da coluna. A visualização da estrutura macroporosa monolítica não permite que haja determinação quantitativa de parâmetros de poros nem classificação dos tipos de poros, o que só pode ser feito por meio de análise porosimétrica [38,182,184].

A dimensão dos glóbulos formados no material monolítico pode ser controlada pela proporção e pelo tipo de solventes porogênicos utilizados para a formação do monolito. Os domínios podem ser maiores ou menores, com canais de largura variável.

As Figuras 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41 mostram as micrografias obtidas para as colunas capilares 3, 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8. À esquerda está uma visão mais ampla do capilar com um aumento de 1000 vezes e, à direita, com um aumento de 5000, 3000 ou 20000 vezes, dependendo do capilar analisado.



Figura 34. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 3 (15% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 35. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 1 (25% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 36. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 2 (35% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de 7000 vezes.

Em relação às fotomicrografias dos capilares 3, 1 e 2, preparados na ausência de água, nota-se que o aumento na proporção de 1,4-butanodiol causa diminuição no tamanho dos glóbulos e na largura dos canais ou macroporos. Por meio de SEM, é possível visualizar macroporos menores, mais estreitos, com o aumento de 1,4-butanodiol, o que indica o efeito deste reagente como agente micro e mesoporogênico. Segundo Jiang *et al.* [74] e Umemura *et al.* [135], macroporos menores e em menor quantidade apontam que a distribuição dos

canais se torna mais homogênea ao longo do leito cromatográfico, havendo uma maior resistência à transferência de massa e um aumento no termo *C*. Em outras palavras, este processo depende do tamanho de poro e influencia o alargamento de banda. Ao mesmo tempo, o menor tamanho dos domínios minimiza a dispersão de Eddy ou, melhor dizendo, o termo *A* da equação de van Deemter que se refere aos caminhos múltiplos existentes na fase estacionária, segundo Eeltink *et al.* [126].

No caso de os glóbulos terem poros menores (micro e mesoporos), sabe-se que quanto menor é o tamanho dos poros (e, portanto maior sua quantidade), maior será a área superficial disponível para a interação entre analito e fase estacionária, fato que está de acordo com o trabalho de Peters *et al.* [86]. Ocorre, desse modo, um maior número de equilíbrios entre analitos e fases móvel e estacionária, o que gera um maior número de pratos e uma maior eficiência cromatográfica [74]. Pode-se afirmar, assim, que o menor tamanho dos domínios corresponde à maior quantidade de pequenos poros e, consequentemente, à maior área de superfície específica [122,124,129,130], o que melhora o desempenho cromatográfico das colunas monolíticas [143].

Segundo Trojer *et al.* [182], um maior valor para a eficiência cromatográfica está relacionada, principalmente, à separação de pequenos analitos. Daí, explicase a busca pelo desenvolvimento de materiais monolíticos com maior quantidade de micro e mesoporos, de acordo com Nischang e Brüggemann [109] – situação, aliás, alcançada neste trabalho, como citado anteriormente. Segundo alguns autores [111,119,120,133,149,158], os monolitos orgânicos em geral são essencialmente macroporosos, pobres em mesoporos e, assim, comumente utilizados para separar biomoléculas, como peptídeos e proteínas.

Alguns estudos, como o de Karenga e El Rassi [117] e Cikalo *et al.* [7], apontam para a relação entre a mobilidade do fluxo eletrosmótico, exibida na Tabela 4, e a quantidade de macroporos (distribuição de poros) que o monolito apresenta. Para esses pesquisadores, uma maior mobilidade de EOF indicaria fluxo mais livre de fase móvel e maior permeabilidade da fase, o que só acontece com fases ricas em macroporos, em que os glóbulos dos domínios são grandes e

aparecem em menor quantidade. Porém, no caso dos monolitos preparados neste trabalho, essa relação não pôde ser estabelecida, pois a queda de permeabilidade, notável e significativa pela observação das fotomicrografias obtidas por SEM, não causou redução da mobilidade do fluxo eletrosmótico ao se considerar as colunas 3, 1 e 2, nesta ordem. Desse modo, outros parâmetros devem estar envolvidos na determinação da mobilidade do EOF, como a homogeneidade da estrutura polimérica ao longo do leito cromatográfico [7], que será avaliada no estudo de repetibilidade desenvolvido neste trabalho.



Figura 37. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 4 (15% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 38. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 5 (25% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 39. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 6 (35% 1,4butanodiol). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.

Para os monolitos preparados na presença de água, pode ser construída a mesma explicação relacionada à influência do conteúdo de solventes porogênicos sobre a porosidade de monolitos preparados na ausência de água. Conforme aumenta a proporção do agente micro e mesoporogênico (1,4-butanodiol), estreitam-se os macroporos, o que pode levar a um aumento na eficiência de separação no caso de essa redução em macroporos estar relacionada ao aumento de micro e mesoporos localizados nos domínios do material monolítico. No caso da coluna 6, a diminuição no tamanho dos glóbulos ocorreu em grande proporção, já que sua composição de fase estacionária contém a maior quantidade de 1,4-butanodiol (30%). Pode-se notar, assim, que os macroporos são muito pequenos e que deve existir uma quantidade apreciável de micro e mesoporos, maior que na coluna 5, já que a área de superfície da fase 6 é consideralvelmente maior que a das demais fases sintetizadas na presença de água. Um alto valor para área superficial de poro é um indicativo de alta eficiência cromatográfica. No entanto, o compromisso que deve existir entre a quantidade de micro e mesoporos e a permeabilidade da coluna deve ser respeitado para que seja possível sua aplicação eletroforética [57,127,131,133]. Desse modo, é possível afirmar que a quantidade de micro e mesoporos formados foi tão grande que prejudicou a permeabilidade da coluna 6, impediu sua avaliação eletroforética e, consequentemente, a determinação da eficiência de separação.

Segundo Moravcová *et al.* [50], os solventes porogênicos são os reagentes responsáveis por fornecer um melhor controle do tamanho dos poros do leito monolítico. As imagens obtidas por SEM apresentam diferenças significativas

conforme varia a proporção entre solventes porogênicos. Essa mesma conclusão é formulada por Bisjak *et al.* [127] que, em seu trabalho, notaram a influência direta dos solventes porogênicos na formação dos poros do monolito, pois a variação em sua proporção afetou a solvatação das cadeias do polímero em crescimento durante a polimerização [136].

No trabalho de Moravcová *et al.* [50], nota-se que a variação entre a proporção de solventes porogênicos ocorreu em uma faixa menor que a realizada neste trabalho (5% v/v), sendo de 2% v/v a variação no conteúdo de solventes porogênicos. Uma variação similar ao trabalho de Moravcová *et al.* [50] no conteúdo dos solventes foi feita no trabalho de Mohr *et al.* [137], em que também foi possível observar diferenças no tamanho dos glóbulos da estrutura monolítica, indicando diferentes tamanhos de poros. Uma pequena variação na quantidade de 1,4-butanodiol (componente dos solventes porogênicos) também causou grande diferença em tamanho de poro no trabalho de Eeltink *et al.* [141].

O fato de a adição em maior quantidade do agente macroporogênico causar aumento no tamanho dos glóbulos e, consequentemente, no tamanho dos canais pode ser explicada ao se considerar que o macroporogênico é um solvente porogênico de pobre solvatação. Segundo Zhong e El Rassi [103], o solvente macroporogênico estabelece que a separação de fases ocorra precocemente. Assim, a nova fase incha preferencialmente com os monômeros, fazendo com que a densidade local dos monômeros nos núcleos que estão inchando seja maior que no restante da solução. Com isso, a polimerização acontece, predominantemente, no interior dos núcleos inchados. Esses núcleos recém-formados podem ser adsorvidos por uma grande quantidade de pré-glóbulos formados anteriormente, resultando no aumento do tamanho dos glóbulos [103,131]. Efeito contrário será observado se ocorrer a adição em maior quantidade de um solvente porogênico com adequada capacidade de solvatação, ou seja, um agente micro e mesoporogênico, como é o caso do 1,4-butanodiol utilizado na presença de álcool isoamílico.



Figura 40. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 7. À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 3000 vezes.



Figura 41. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar 8. À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 20000 vezes.

Ao observar as fotomicrografias dos capilares 7 e 8, nota-se uma grande quantidade de pequenos glóbulos, além de canais muito estreitos, o que pode indicar alta proporção de micro e mesoporos presentes nesses glóbulos. A observação é coerente com o fato de essas colunas capilares apresentarem altas eficiências de separação e alto valor de área superficial, conforme indicam os resultados porosimétricos. O alto valor de área de superfície específica para a fase estacionária de composição 8, refletido no pequeno tamanho dos glóbulos da Figura 41 (presença de micro e mesoporos), se deve ao fato de o parâmetro de solubilidade do agente macroporogênico cicloexanol (11,4 H) ser muito próximo ao do agente micro e mesoporogênico 1,4-butanodiol (12,1 H), diferentemente do álcool isoamílico e amílico usados na síntese das outras fases estacionárias, com valores de 10,0 e 10,9 H, respectivamente [192]. Quanto mais próximos entre si são os parâmetros de solubilidade dos solventes porogênicos (solvente "bom"), a separação das fases formadas ocorre tardiamente, gerando poros pequenos (mais micro e mesoporos) responsáveis pela alta área superficial de poro.

É importante notar, não só nas fotomicrografias mostradas anteriormente como em todas as que serão exibidas a seguir, a ligação entre o material monolítico e a parede pré-tratada da coluna capilar, essencial para que se tenha estabilidade mecânica durante as análises cromatográficas [182]. A ligação monolito-parede do capilar só ocorre devido à etapa de silanização antes da polimerização *in situ* a que a coluna é submetida. Essa etapa é tão importante que há estudos recentes abordando a eficácia da adesão do material monolítico ao capilar em relação ao tempo que leva para a conclusão do processo de silanização [111]. Também há trabalhos que exploram diferentes reagentes a ser usados na adesão do material monolítico à parede interna da coluna capilar [193].

4.1.3. Separação de alquilparabenos

Os alquilparabenos são moléculas muito pequenas, citadas na literatura do mesmo modo que os alquilbenzenos: como analitos que não podem ser separados por material monolítico polimérico, já que necessitam de poros muito pequenos na fase estacionária para que nela possam penetrar e acessar seus sítios de adsorção e, assim, possibilitar que a separação ocorra de forma eficiente [137].

Dessa forma, pode-se afirmar que a separação já realizada de alquilbenzenos e, posteriormente, de alquilparabenos indica que o material monolítico sintetizado é micro e mesoporoso, como foi confirmado pelos resultados porosimétricos e pela análise das imagens obtidas por SEM.

As estruturas químicas dos alquilparabenos usados como analitos de separação aparecem na Figura 42.



Figura 42. Fórmulas estruturais dos 4 alquilparabenos. 1. Metilparabeno; 2. Etilparabeno; 3. Propilparabeno; 4. Butilparabeno.

A coluna usada para separar os alquilparabenos foi a de maior eficiência cromatográfica, a 7. Várias condições de força cromatográfica foram avaliadas e otimizou-se a proporção da fase móvel usada, sendo a solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 70:30 v/v. A Figura 43 apresenta a separação dos alquilparabenos nessas condições.



Figura 43. Eletrocromatograma da mistura de alquilparabenos no capilar 7 (1. Tioureia; 2. Metilparabeno; 3. Etilparabeno; 4. Propilparabeno; 5. Butilparabeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 70:30 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 254 nm; temperatura: 25 °C.

Como pode ser notada, a ordem de eluição destes analitos levemente polares segue a ordem de diferença de uma metila. Quanto maior a quantidade de grupos metilênicos, maior a retenção na fase monolítica do tipo C18, ao que se conclui que a fase estacionária proposta é seletiva para esses analitos, bem como para os alquilbenzenos usados para cálculo de eficiência ao longo de todo este trabalho.

4.1.4. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) são compostos neutros e muito apolares e, como tais, devem apresentar uma forma de interação bastante efetiva com as fases estacionárias sintetizadas, já que o monômero precursor das mesmas é do tipo C18, altamente apolar. Conforme citado na introdução deste trabalho, grande parte dos estudos relacionados à separação desses hidrocarbonetos usa fases estacionárias monolíticas com grupos funcionais aromáticos [85] a fim de aumentar a seletividade por esses compostos essencialmente aromáticos. A maioria das separações de PAH, no entanto, foi ainda conduzida em colunas de separação do tipo particulada e, guando as tentativas ocorreram em colunas monolíticas, essas tinham surfactante compondo o eluente ou, então, apresentavam cadeias alquilas menores por causa da já discutida dificuldade de preparo de fases estacionárias de caráter altamente hidrofóbico, como C18 [1]. Trabalhos recentes relatam a dificuldade em separar esses analitos com cadeias alguilas alifáticas sozinhas, sem a mistura com monômeros aromáticos. A possibilidade de mesclar monômeros alquila a aromáticos promove o desenvolvimento de diferentes fases estacionárias, com distintas propriedades de retenção, a exemplo das colunas segmentadas [116] e das colunas com ligantes mistos [117]. Recentemente, o grupo de ALOthman [129,139] realizou tentativas de separação de PAH com fases estacionárias apresentando apenas grupos alguila. Porém, os valores de eficiência foram muito pequenos, abaixo de 10000 pratos m⁻¹, e permitiram a separação de poucos PAH, com característica cauda de pico.

Neste trabalho, 12 PAH foram obtidos e separados empregando-se a coluna 2, sintetizada com álcool isoamílico:1,4-butanodiol 65:35 v/v. As fórmulas estruturais destes analitos estão na Figura 44.



Figura 44. Fórmulas estruturais de 12 PAH. 1. Naftaleno; 2. Acenaftileno; 3. Fluoreno; 4. Acenafteno; 5. Fenantreno; 6. Antraceno; 7. Fluoranteno; 8. Pireno; 9. Criseno; 10. Benzo[a]antraceno; 11. Benzo[b]fluoranteno; 12. Benzo[a]pireno.

A proporção da fase móvel foi otimizada para que se obtivesse a melhor resolução possível entre os picos. O eletrocromatograma resultante aparece na Figura 45. Antes de chegar a ele, os padrões de cada PAH foram injetados individualmente para que pudessem ser identificados no eletrocromatograma final.



Figura 45. Eletrocromatograma da mistura de 12 PAH com tioureia no capilar 2
(1. Tioureia; 2. Naftaleno; 3. Acenaftileno; 4. Fluoreno; 5. Acenafteno; 6. Fenantreno; 7. Antraceno; 8. Fluoranteno; 9. Pireno; 10. Criseno; 11. Benzo[a]antraceno; 12. Benzo[b]fluoranteno; 13. Benzo[a]pireno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 50:50 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 228 nm; temperatura: 25 °C.

Este eletrocromatograma mostra que a coluna monolítica C18 desenvolvida no presente trabalho tem alta seletividade em relação à separação de compostos

neutros apolares, como os PAH, devido às características altamente apolares da fase estacionária. Os analitos 10 e 11 apresentam grande semelhança estrutural, como é possível observar na Figura 44 e, assim, como a diferença entre eles se dá apenas em termos espaciais, eles não puderam ser separados com esta fase estacionária.

4.2. Colunas preparadas variando-se a proporção entre monômeros e solventes porogênicos

4.2.1. Caracterização eletroforética

As colunas capilares preparadas a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos também foram condicionadas com solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v até a obtenção da linha de base estável. Após este processo, as colunas foram avaliadas eletroforeticamente.

Os parâmetros cromatográficos calculados para as colunas A, B, C, D e E aparecem na Tabela 7.

Capilar	Monômeros:solventes porogênicos / % v/v	<i>N* /</i> pratos	<i>N/L_{ef} /</i> pratos m ⁻¹	RSD** / %	Η / μm	<i>k</i> *	L _{ef} / cm	Tempo de análise / min	Pressão máxima / bar
В	29:71	7000	16700	2	60	2,1	44,0	15,0	150
С	31:69	16000	33700	13	30	2,9	47,0	30,0	130
А	33:67	10000	23400	15	43	2,0	43,0	22,0	120
D	35:65	1000	3000	8	330	1,4	43,0	35,0	170
E	37:63	8000	27500	17	37	3,3	28,0	11,0	100
F	40:60	-	-	-	-	-	40,0	-	200

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se aproporção entre os monômeros e os solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

* calculado para o pentilbenzeno.

** estimativa do desvio padrão relativo.

Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a eficiência de separação e a variação da proporção de monômeros. A Tabela 7, ao ser

analisada, mostrou que a coluna menos eficiente, D, alcançou um dos maiores valores de pressão durante a lavagem na bomba depois da síntese, atingindo cerca de 170 bar. Tal constatação pode indicar que os canais para fluxo de fase móvel – os macroporos – são mais estreitos e dificultam sua passagem, caracterizando a fase estacionária como pouco permeável. A fase estacionária da coluna F deve ter apresentado canais ainda mais estreitos ou grande heterogeneidade no leito cromatográfico, pois não foi observado fluxo livre da fase móvel nem em alta pressão (200 bar), tornando impossível, com isso, sua avaliação eletroforética.

Os parâmetros eletroforéticos foram calculados segundo as equações 7 e 8 e estão reunidos na Tabela 8.

Capilar	Monômeros:solventes porogênicos / % v/v	Campo elétrico (<i>E</i>) / V cm ⁻¹	Velocidade do EOF (v_{eo}) / cm min ⁻¹	Mobilidade do EOF ($\mu_{e\rho}$) / 10 ⁻³ cm ² V ⁻¹ min ⁻¹
В	29:71	583	9,8 ± 0,1	16,9 ± 0,2
С	31:69	545	6,33 ± 0,02	11,60 ± 0,04
А	33:67	588	7,02 ± 0,07	11,9 ± 0,1
D	35:65	588	3,3 ± 0,1	5,5 ± 0,2
E	37:63	833	12,14 ± 0,04	14,57 ± 0,06
F	40:60	-	-	-

Tabela 8. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Ao se observar a Tabela 8, não se notou tendência direta entre a mobilidade do fluxo eletrosmótico e o conteúdo de monômeros, conforme previsto no trabalho de Cikalo *et al.* [7], já que o fluxo eletrosmótico gerado dentro da coluna capilar está muito mais relacionado à forma como ocorreu a distribuição dos poros ao longo do leito monolítico, do que ao aumento ou à diminuição do tamanho dos poros conforme o teor de solventes porogênicos foi elevado ou reduzido.

As Figuras 46 a 50 mostram os eletrocromatogramas obtidos para os capilares A a E.



Figura 46. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar B (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 47. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar C (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 48. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar A (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 49. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar D (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 50. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar E (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.

A coluna capilar F permaneceu por 410 h na bomba de HPLC sob condicionamento com solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v. A fase móvel começava a passar pelo capilar quando a pressão atingia cerca de 100 bar. A partir de então, a pressão subia ininterruptamente até atingir 250 bar, quando o capilar se soltava da conexão da bomba. Segundo Bedair e El Rassi [73], leitos monolíticos que necessitam de altas pressões para serem lavados com fase móvel têm muitos microporos, o que significa uma menor quantidade de macroporos e implica em uma menor permeabilidade da fase móvel na fase estacionária. Desse modo, mesmo ao se considerar que a presença de microporos indica maior área superficial para interação com os solutos, a redução excessiva do tamanho dos poros pode comprometer a permeabilidade, fazendo com que não seja possível a separação dos solutos. Altas pressões de lavagem de coluna com fase móvel também podem ser sinônimos de heterogeneidade de leito cromatográfico. Ou, ainda, segundo Wan [23] e Eeltink et al. [30], uma redução muito grande no tamanho dos poros pode ocasionar sobreposição de duplas camadas elétricas formadas nas superfícies dos poros, levando à heterogeneidade na velocidade do EOF e à baixa eficiência. A redução de permeabilidade da coluna implica em um funcionamento inadequado perante uma separação, o que pôde ser confirmado pela observação dos valores de corrente elétrica, medidos durante o condicionamento da coluna no equipamento de CE – eles não ultrapassaram 0,6 µA. Assim, tornou-se impossível calcular parâmetros cromatográficos para a coluna F, pois não se viabilizou sua avaliação eletroforética.

4.2.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias

Como já explicado no item 4.1.1.1, a seletividade metilênica de cada fase estacionária sintetizada determinou-se pela construção da curva referente à equação 9, o que possibilitou a análise da hidrofobicidade de cada fase monolítica. A Tabela 9 mostra os parâmetros calculados por meio das curvas do logaritmo do fator de retenção em função do número de carbonos.

Capilar	Monômeros:solventes porogênicos / % v/v	$\log \alpha$	α	Coeficiente de correlação			
В	29:71	0,0805	1,2036	0,9971			
С	31:69	0,0901	1,2304	0,9948			
А	33:67	0,1379	1,3738	0,9998			
D	35:65	0,0664	1,1653	0,9951			
E	37:63	0,0998	1,2583	0,9982			
F	40:60	-	-	-			

Tabela 9. Seletividade metilênica das colunas preparadas variando-se a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Os coeficientes de correlação determinados foram maiores que 0,99 e mostraram que todas as fases apresentaram seletividade adequada para separar compostos aromáticos apolares, como os alquilbenzenos.

Os valores encontrados para seletividade metilênica compreendem-se na faixa de 1,16 a 1,37, revelando que pertecem à faixa adequada de seletividade de 0,9 a 1,6 [194]. Porém, não se observou relação direta entre esses valores e o aumento no teor de monômeros, nem entre estes e os valores de eficiência de separação, assim como no trabalho de Moravcová *et al.* [134]. Pode-se afirmar

que estes valores de α estão relacionados ao fenômeno de transferência de massa [105] no interior da coluna e, portanto, à maneira como os glóbulos se distribuem ao longo do leito monolítico, que não é formado de maneira uniforme na maioria das vezes por causa de uma série de parâmetros envolvidos na reação de copolimerização (a exemplo do tempo de reação), como será discutido no estudo de repetibilidade realizado neste trabalho.

4.2.2. Caracterização físico-química

4.2.2.1. Porosimetria

As amostras de fases estacionárias preparadas com variação na proporção entre solventes porogênicos e monômeros não foram as mesmas que preencheram as colunas capilares, pelo mesmo motivo discutido anteriormente. Todas elas, no entanto, foram preparadas no mesmo dia para que ocorresse a menor variação possível entre os fatores experimentais que podem afetar os resultados porosimétricos. Os resultados foram obtidos pela aplicação do método de adsorção e dessorção de nitrogênio (BET) e aparecem na Tabela 10.

Fase	Eficiência das colunas de mesma	Monôr Solventes p %	neros : orogênicos / v/v	Área superficial	Volume de poro
estacionana	composição ∕ pratos m ⁻¹	Monômeros Solventes porogênico		/ m² g ⁻¹	$cm^3 g^{-1}$
G	*	20	80	5,34	9,07
Н	*	25	75	3,77	5,55
В	16700	29	71	3,56	5,03
С	33700	31	69	4,38	9,60
A	23400	33	67	3,12	4,69
D	3000	35	65	2,53	3,72
E	27500	37	63	2,23	3,34
F	-	40	60	1,69	2,50

Tabela 10. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico em que se variou a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos.

Obs.: *: Colunas não preparadas anteriormente.

-: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Diferentemente do que constataram muitos trabalhos [54,69,89,140,142], a menor proporção de solventes porogênicos não aumentou a área superficial das fases estacionárias. Ao contrário, reduziu-a – fato só não observado na fase C. Isso, talvez, se deva ao fato de que tais trabalhos envolvem diferentes composições e tipos de monômeros e de agentes porogênicos daqueles empregados neste trabalho. Até o momento não foram encontrados trabalhos que relacionem, simultaneamente, octadecilmetacrilato e etilenodimetacrilato com álcool amílico e 1,4-butanodiol na síntese do material monolítico.

Na busca de uma explicação para essa constatação, é possível analisar a discussão sugerida pelo grupo de Viklund et al. [123]. Em seu trabalho, foram avaliadas fases estacionárias compostas por glicidilmetacrilato como monômero precursor, tendo, como agentes porogênicos, o isooctano e o tolueno, sendo o primeiro, o solvente macroporogênico e, o segundo, o solvente micro e mesoporogênico. Segundo Viklund et al., quando a proporção de isooctano é máxima, o efeito da qualidade do solvente (referente a parâmetros de solubilidade) é dominante e a quantidade de solvente porogênico é menos crítica. No presente trabalho, todas as fases monolíticas sintetizadas a partir da variação da proporção dos monômeros em relação aos solventes porogênicos foram preparadas mantendo-se o teor máximo de 1,4-butanodiol, agente micro e mesoporogênico. Dessa maneira, obteve-se o contrário do trabalho de Viklund et al.: o efeito da qualidade do solvente não domina, mas a quantidade de solvente porogênico é mais crítica. Assim, ao reduzir a proporção de solventes porogênicos, cujo conjunto é caracteristicamente microporogênico, eleva-se o volume de poros maiores e reduz-se o volume dos poros menores, diminuindo, como conseguência, a área de superfície.

Maiores valores de área superficial foram obtidos conforme se aumentou a proporção de solventes porogênicos, com exceção do material C. Porém, o aumento em área superficial de poro não pôde ser relacionado diretamente à eficiência de separação obtida para cada coluna, já que os valores de eficiência obtidos não acompanharam um aumento ou uma redução de área superficial. Para verificar se essa variação de eficiência ocorre de coluna para coluna, o

próximo passo deste trabalho consistiu em testar a repetibilidade de síntese das colunas.

No trabalho de Buszewski e Szumski [27], a falta de relação entre os valores de eficiência e de área superficial para fases à base de lauril e octadecilmetacrilato também foi observada. Ainda no estudo de Sáfrány *et al.* [52], os valores de área superficial para o monolito de metacrilato, além de serem menores que 5 m² g⁻¹, não apresentaram relação de aumento ou redução com o conteúdo de monômeros e solventes porogênicos na mistura de polimerização.

As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio também apresentaram perfil semelhante àquelas referentes às fases estacionárias preparadas com variação do tipo e da proporção dos solventes porogênicos. Em outras palavras, as isotermas indicaram a presença de micro e mesoporos no material – a distribuição desses últimos pôde ser observada pelas curvas de distribuição de poros obtidas pelo método BJH. Foi possível identificar, ainda, a presença de grande quantidade de macroporos no material devido ao final da isoterma não ser uma superfície plana, indicando que nem todos os macroporos foram preenchidos mesmo em alta pressão relativa porque, provavelmente, há muitos macroporos na estrutura.

As Figuras 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 exibem as isotermas obtidas para as fases estacionárias G, H, B, C, A, D, E e F.



Figura 51. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária G.



Figura 52. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H.


Figura 53. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária B.



Figura 54. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária C.



Figura 55. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária A.



Figura 56. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária D.



Figura 57. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária E.



Figura 58. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária F.

Em relação às curvas de distribuição de poros na região mesoporogênica (faixa de pressão relativa de 0,42 a 0,995), nota-se, na ordem de redução de solventes porogênicos, uma diminuição na quantidade de mesoporos, com exceção da fase C, o que está em concordância com a redução em área superficial, característica de material com mais macroporos. Além disso, a maioria

das fases apresentou uma quantidade considerável de mesoporos com tamanhos que se concentram na região entre 2 e 15 nm, sendo que cada uma delas, individualmente, apresenta uma maior proporção de mesoporos de determinado tamanho, compreendido na faixa citada anteriormente. Outro fato que comprova a redução de mesoporos na ordem de redução dos solventes porogênicos é a observação das isotermas dessas fases, cujo volume de gás adsorvido também diminui nesta ordem, indicando redução na quantidade de mesoporos.

As Figuras 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 e 66 apresentam as curvas de distribuição de poros referentes às fases estacionárias G, H, B, C, A, D, E e F.



Figura 59. Curva de distribuição de poros da fase estacionária G.



Figura 60. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H.



Figura 61. Curva de distribuição de poros da fase estacionária B.



Figura 62. Curva de distribuição de poros da fase estacionária C.



Figura 63. Curva de distribuição de poros da fase estacionária A.



Figura 64. Curva de distribuição de poros da fase estacionária D.



Figura 65. Curva de distribuição de poros da fase estacionária E.



Figura 66. Curva de distribuição de poros da fase estacionária F.

As t-curvas, obtidas pela aplicação do método *t-plot* para a avaliação dos microporos do material monolítico, mostraram que as fases estacionárias preparadas a partir da variação da proporção entre solventes porogênicos e monômeros também possuem microporos. Todas as t-curvas apresentaram perfis semelhantes.

4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

Os capilares preparados a partir da variação da proporção entre solventes porogênicos e monômeros também foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias em visão mais e menos ampliada mostram a morfologia do material monolítico componente da fase estacionária.

As Figuras 68, 69, 70, 71, 72 e 73 exibem as fotomicrografias das colunas capilares B, C, A, D, E e F e, à extrema direita, está uma fotomicrografia com ampliação de 5000 vezes, relativa ao material monolítico preparado no frasco –

113

para todas as fases em frasco, o preparo ocorreu em um mesmo dia para que fosse possível determinar os parâmetros porosimétricos. A Figura 67 mostra as fotomicrografias do material monolítico de composição G e H, que, nesta etapa, não preencheram nenhuma coluna capilar.



Figura 67. Fotomicrografias eletrônicas de varredura das fases G, à esquerda (80% solventes porogênicos) e H, à direita (75% solventes porogênicos). Ampliação de 5000 vezes.



Figura 68. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B (71% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 69. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C (69% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1000 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 70. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A (67% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 71. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D (65% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, no meio e à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 72. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E (63% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes, no meio de 20000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 73. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F (60% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1000 vezes, no meio de 20000 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.

Considerando a ordem dos capilares B, C, A, D e E, observa-se que os canais entre os domínios de glóbulos se alargam, o que indica maior quantidade de macroporos ao se comparar as fotomicrografias de menor ampliação. Este aumento em macroporos é muito menos evidente e significativo em comparação às fotomicrografias referentes às colunas preparadas com variação do tipo e da proporção de solventes porogênicos, já que estes são responsáveis por um controle mais fino e preciso da estrutura porosa [136].

O aumento em macroporos ocorre conforme a proporção de solventes porogênicos em relação aos monômeros diminui. Macroporos estreitos e em menor quantidade, obtidos com maiores proporções de solventes porogênicos, podem indicar maior número de micro e mesoporos no monolito. Estes são os responsáveis pela maior área superficial de poro e, consequentemente, por mais interações entre analito-fase estacionária ao longo da coluna. Segundo os resultados porosimétricos, ao aumentar a proporção de solventes porogênicos, eleva-se a área superficial das fases estacionárias, o que está de acordo com o fato de haver, provavelmente, mais micro e mesoporos, e menos macroporos, como se nota nas fotomicrografias. A mesma tendência foi constatada no trabalho de Nischang *et al.* [149], em que materiais monolíticos de menor densidade, ou seja, com menor conteúdo de monômeros e maior de solventes porogênicos, apresentaram, em imagens obtidas por SEM, menores dimensões de glóbulos formadores do esqueleto polimérico.

Ao se comparar apenas as fotomicrografias dos materiais de fase estacionária (Figura 67 e à direita nas demais figuras), também é possível observar um sutil aumento no tamanho dos glóbulos conforme se diminui a proporção de solventes porogênicos, o que indica que há mais canais e, certamente, menos micro e mesoporos, daí o motivo de, nesta sequência, ocorrer uma redução no valor de área superficial de poro. Na Figura 69 à direita, referente ao material C, é possível notar que os glóbulos apresentam tamanhos irregulares, isto é, há glóbulos pequenos misturados aos maiores. Este deve ter sido o motivo pelo qual se obteve um alto valor de área de superfície para este material,

116

discordante em relação à redução sequencial deste parâmetro conforme houve diminuição no teor de solventes porogênicos.

Como não foi possível realizar a avaliação eletroforética do capilar F, mesmo após muitas horas de condicionamento com fase móvel, conclui-se que o leito cromatográfico formado é heterogêneo, apresentando ao longo do capilar macroporos muito estreitos e, possivelmente, maior quantidade de microporos, o que comprometeu a permeabilidade da coluna e não permitiu sua avaliação eletroforética. Desse modo, a impossibilidade de análise pode ser justificada pela heterogeneidade do leito cromatográfico, o que leva a um EOF irregular ao longo da coluna.

Segundo Jiang *et al.* [74], nota-se que um menor tempo de análise é obtido quando a fase apresenta maior quantidade de macroporos, ou seja, mais canais por onde a fase móvel pode fluir. Como as colunas em CEC têm comprimento variável, devido à dificuldade experimental de manter um comprimento similar entre as colunas sintetizadas, não foi possível comparar o tempo de análise da amostra teste em cada uma delas.

4.2.2.3. Análise elementar

A caracterização por análise elementar foi realizada para determinar a porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio no material monolítico. Os resultados obtidos estão na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros de análise elementar para as amostras de material monolítico em que se variou a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos.

Amostra	Eficiência das colunas de mesma composição / pratos m ⁻¹	Monôr Solventes p %	meros : orogênicos / v/v	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
		Monômeros	Solventes porogênicos			
G	*	20	80	71,55	10,20	24,50
Н	*	25	75	71,47	10,44	22,50
В	27000	29	71	70,75	10,07	25,00
С	45000	31	69	71,82	10,28	19,00
A	19000	33	67	71,35	9,88	24,50
D	4000	35	65	71,04	10,44	25,50
Ē	35000	37	63	71,04	10,44	16,50
F	-	40	60	71,53	10,56	18,00

Obs.: *: Colunas não preparadas anteriormente.

-: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Nenhuma diferença significativa foi observada nos resultados obtidos por análise elementar e isto se deve, provavelmente, ao fato de a proporção entre o monômero funcional octadecilmetacrilato e o agente de entrecruzamento etilenodimetacrilato ter sido mantida constante durante o preparo de todas as fases monolíticas.

4.2.3. Estudo de repetibilidade de síntese das fases estacionárias

4.2.3.1. Fases estacionárias de diferentes composições poliméricas

De acordo com Geiser *et al.* [122] e Kositarat *et al.* [138], há poucos estudos envolvendo investigação sobre a repetibilidade de preparo de colunas monolíticas, o que é essencial para aumentar o interesse sobre a síntese dessas fases e tornar seu uso rotineiro. Para Belenkii [32], a repetibilidade de síntese depende

fortemente da tecnologia empregada no preparo do monolito e, também, da qualificação do operador.

Assim, neste trabalho, a repetibilidade de síntese das fases estacionárias foi estudada por meio do preparo de duas colunas de mesma composição com posterior avaliação eletroforética e física por SEM. Cada coluna foi preenchida com a mesma mistura de polimerização e inserida no capilar a uma vazão de 20 mL h⁻¹ com auxílio de uma bomba do tipo seringa.

4.2.3.1.1. Caracterização eletroforética

Os parâmetros cromatográficos calculados estão na Tabela 12.

Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / % v/v	N* / pratos	<i>N/L_{ef} /</i> pratos m ⁻¹	RSD** / %	Η / μm	<i>k</i> *	L _{ef} / cm	Tempo de análise / min	Pressão máxima/ bar
G1	20:80	5500	13200	3	75	1,3	42,0	14,0	80
G2	20:80	10000	14800	8	68	1,2	70,0	25,0	100
H1	25:75	3000	13800	17	74	1,9	23,0	5,5	80
H2	25:75	28000	50000	12	20	2,1	56,0	28,0	80
B1	29:71	11200	31000	21	33	2,3	36,0	13,0	90
B2	29:71	4800	11600	1	86	2,4	42,0	24,0	110
C1	31:69	15000	31000	6	32	2,4	48,0	20,0	160
C2	31:69	14000	18000	19	57	2,6	76,0	55,0	200
A1	33:67	4000	11600	10	86	2,9	38,0	15,0	195
A2	33:67	5000	20000	7	50	2,8	25,0	7,0	100
D1	35:65	18000	32700	9	31	4,0	56,0	45,0	65
D2	35:65	12000	30000	10	34	2,8	41,0	20,0	60
E1	37:63	6000	19500	4	51	2,0	31,0	8,5	50
E2	37:63	19000	31300	4	32	2,0	60,0	30,0	160
F1	40:60	4000	14500	10	70	2,8	26,0	6,0	130
F2	40:60	20000	31800	13	32	3,7	63,0	50,0	60

Tabela 12. Parâmetros cromatográficos das colunas preparadas variando-se a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de repetibilidade

Obs.: * calculado para o pentilbenzeno.

** estimativa do desvio padrão relativo.

Em uma análise da Tabela 12, nota-se que os valores de eficiência cromatográfica obtidos não são reprodutíveis para cada par de colunas

sintetizadas com a mesma mistura de polimerização, o que está de acordo com o que foi concluído por Deyl e Svec [38] para a maioria das colunas monolíticas. Segundo esses autores, a comparação de eficiência não pode ser feita com rigor, já que este parâmetro depende de muitos fatores, como a composição e a velocidade linear da fase móvel, a temperatura, o gradiente de campo elétrico e a retenção do soluto. Para cada estrutura monolítica formada, por exemplo, uma pequena diferença na sua formação pode levar a diferenças na velocidade da fase móvel e, consequentemente, na eficiência de separação cromatográfica. Comparando os valores de eficiência entre colunas de mesma composição exibidos nas Tabelas 7 e 12, percebe-se, também, a variação nestes valores, o que confirma a falta de repetibilidade na eficiência entre essas colunas.

A Tabela 13 mostra os parâmetros eletroforéticos calculados para as fases estacionárias sintetizadas nesta etapa do trabalho, por meio da aplicação das equações 7 e 8.

Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / %	Campos elétrico (<i>E</i>) / V cm ⁻¹	Velocidade do EOF (v_{eo}) / cm min ⁻¹	Mobilidade do EOF (μ_{eo}) / 10 ⁻³ cm ² V ⁻¹ min ⁻¹
•	V/V	-		
G1	20:80	600	7,98 ± 0,07	$13,3 \pm 0,1$
G2	20:80	385	$6,9 \pm 0,2$	17,9 ± 0,5
H1	25:75	968	14,25 ± 0,03	14,72 ± 0,03
H2	25:75	469	6,53 ± 0,06	13,9 ± 0,1
B1	29:71	682	9,86 ± 0,04	14,45 ± 0,06
B2	29:71	606	$6,2 \pm 0,2$	10,3 ± 0,3
C1	31:69	536	8,76 ± 0,06	16,4 ± 0,1
C2	31:69	357	$5,40 \pm 0,07$	15,1 ± 0,2
A1	33:67	652	10,43 ± 0,04	16,00 ± 0,06
A2	33:67	909	14,9 ± 0,1	16,40 ± 0,08
D1	35:65	469	6,63 ± 0,04	14,15 ± 0,08
D2	35:65	612	8,8 ± 0,1	14,3 ± 0,2
E1	37:63	769	12,02 ± 0,01	15,63 ± 0,02
E2	37:63	441	5,98 ± 0,04	13,56 ± 0,09
F1	40:60	882	18,160 ± 0,006	20,580 ± 0,006
F2	40:60	423	$6,47 \pm 0,04$	15,30 ± 0,08

Tabela 13. Parâmetros eletroforéticos das colunas preparadas variando-se a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de repetibilidade.

Assim como as demais colunas capilares preparadas neste trabalho, estas, sintetizadas especialmente para teste da repetibilidade de preparo, foram condicionadas com solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v, até que fosse observada uma linha de base estável durante a obtenção de dados pelo equipamento. As Figuras 74 a 89 mostram os eletrocromatogramas obtidos com cada uma das colunas, ordenadas segundo a Tabela 12 – estes foram obtidos em triplicata para cálculo dos parâmetros cromatográficos.



Figura 74. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar G1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 75. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar G2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 76. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 77. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 78. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar B1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.







Figura 80. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar C1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 81. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar C2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 82. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar A1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 83. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar A2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 84. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar D1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 85. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar D2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 86. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar E1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 87. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar E2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 88. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar F1 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 89. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar F2 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.

Ao analisar os eletrocromatogramas exibidos anteriormente, notam-se diferenças significativas, na maioria deles, entre colunas de mesma composição. Exemplos são os eletrocromatogramas relativos às colunas H1 e H2, em que os picos de H1 apresentam cauda e grande assimetria entre eles, enquanto que os picos de H2 não têm cauda, apresentam uma maior simetria e são, ainda, mais resolvidos. Essas observações refletem o fato de a coluna H2 apresentar eficiência de separação muito maior que a coluna H1 (50000 pratos m⁻¹ da primeira contra 13800 pratos m⁻¹ da segunda).

4.2.3.1.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias

Da mesma forma que nos itens 4.1.1.1 e 4.2.1.1, a seletividade metilênica das fases monolíticas também foi determinada para aquelas sintetizadas durante o estudo de repetibilidade, aplicando-se a equação 9. A Tabela 14 reúne os parâmetros relacionados à hidrofobicidade determinada por curvas do logaritmo do fator de retenção pelo número de carbonos de cada analito.

Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / % v/v	log α	α	Coeficiente de determinação
G1	20:80	0,1478	1,4054	0,9992
G2	20:80	0,1352	1,3652	0,9998
H1	25:75	0,1476	1,4049	0,9998
H2	25:75	0,1497	1,4115	0,9998
B1	29:71	0,1446	1,3950	0,9998
B2	29:71	0,1484	1,4073	0,9998
C1	31:69	0,1425	1,3884	0,9998
C2	31:69	0,1444	1,3943	0,9998
A1	33:67	0,1507	1,4148	0,9998
A2	33:67	0,1445	1,3949	0,9968
D1	35:65	0,1583	1,4398	0,9998
D2	35:65	0,1474	1,4041	0,9996
E1	37:63	0,1433	1,3908	0,9998
E2	37:63	0,1400	1,3805	0,9998
F1	40:60	0,1404	1,3817	0,9998
F2	40:60	0,1506	1,4145	0,9990

Tabela 14. Seletividade metilênica das colunas preparadas variando-se a proporção entre os monômeros e os solventes porogênicos para estudo de repetibilidade.

Para todas as fases monolíticas sintetizadas nesta etapa do trabalho, o valor para a seletividade metilênica se encontrou ao redor de 1,4, enquadrado na faixa adequada para a seletividade [194]. De acordo com Lav *et al.* [136], o valor de seletividade hidrofóbica ao redor de 1,4 é o que ocorre com mais frequência para monolitos de metacrilato, tendo grupos funcionais alifáticos (seletores de fase reversa).

Os coeficientes de correlação obtidos foram maiores que 0,99, indicando que todas as fases são seletivas para alquilbenzenos.

Segundo Carbonnier *et al.* [71], a medida de α é muito importante para a avaliação dos efeitos de mudança de composição da matriz monomérica e da natureza do seletor hidrofóbico. Como os monolitos apresentam o mesmo seletor hidrofóbico, do tipo C18, é esperado que todos apresentem seletividades semelhantes, o que implica em hidrofobicidades similares. As pequenas diferenças entre seus valores podem estar relacionadas a diferenças de morfologia estrutural no material monolítico ao longo de seu leito, havendo, assim, diferentes resistências à transferência de massa [105]. Esse mesmo motivo pode ser dado

para as diferentes mobilidades de EOF observadas na Tabela 13. Para verificar as diferenças em morfologia do monolito, avaliou-se o seu aspecto estrutural por meio de SEM ao longo do leito da coluna.

4.2.3.1.2. Caracterização físico-química

4.2.3.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

Para cada coluna sintetizada em duplicata com a mesma mistura de polimerização, foram obtidas fotomicrografias a fim de observar e comparar a morfologia da estrutura monolítica em cada par de colunas similares e entre aquelas preparadas a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos. As Figuras 90 a 105 mostram as micrografias obtidas segundo a ordem de colunas mostrada na Tabela 12.



Figura 90. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G1 (80% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 91. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G2 (80% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 92. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H1 (75% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 93. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H2 (75% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 94. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B1 (71% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 95. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B2 (71% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 96. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C1 (69% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 97. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C2 (69% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 98. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A1 (67% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 99. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A2 (67% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 100. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D1 (65% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 101. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D2 (65% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 102. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E1 (63% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 103. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E2 (63% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 104. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F1 (60% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 105. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F2 (60% solventes porogênicos). À esquerda, ampliação de 1200 vezes e, à direita, ampliação de 5000 vezes.

Ao serem observadas atentamente, as Figuras 90 a 97 com ampliação de 5000 vezes revelam um sutil aumento na largura dos canais (ou macroporos) e no tamanho dos domínios do material monolítico, o que pode estar relacionado a uma diminuição na quantidade de micro e mesoporos. Este último fato ocorre devido aos resultados porosimétricos obtidos para as fases estacionárias sintetizadas pela variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos, em que se notou uma redução no valor de área superficial conforme se diminuiu o teor de solventes porogênicos na composição da mistura de polimerização, concluindo-se que, neste sentido, houve um aumento em macroporos. Analisando as Figuras 98 até 105, é possível observar que a estrutura macroporosa do material monolítico se manteve com aparência similar, não havendo redução nem aumento no tamanho dos glóbulos e nos espaços entre os mesmos.

A aparência dos monolitos é muito semelhante nas fotomicrografias observadas com ampliação de 1200 vezes, já que nelas é possível ter uma visão geral do material monolítico formado no interior da coluna capilar.

Diferenças sutis em relação ao tamanho dos glóbulos foram observadas entre as fotomicrografias de fases estacionárias de mesma composição. Nas Figuras 92 e 93, 102 e 103, é possível notar a formação de "buracos" na seção transversal do material monolítico de uma das duplicatas. Já nas Figuras 94 e 95, referentes às fases B1 e B2, notam-se diferenças de tamanho dos glóbulos. Esta falta de uniformidade na estrutura monolítica entre fases de mesma composição reflete a falta de repetibilidade de síntese das fases monolíticas, como será concluído com os estudos posteriores acerca de repetibilidade.

4.2.3.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura ao longo do leito cromatográfico

Ao contrário do que constatou o estudo de Fang *et al.* [185], a morfologia dos poros da maioria das colunas monolíticas não foi consistente ao longo do comprimento das colunas. Fotomicrografias de duas regiões diferentes do mesmo capilar foram obtidas (Figuras 106 a 121) e notou-se que, na maioria das vezes, a estrutura do monolito é diferente, não uniforme, embora os poros permaneçam altamente interconectados. A falta de uniformidade característica do material ao longo da coluna reforça a conclusão de que há falta de repetibilidade durante sua síntese, até mesmo em colunas preenchidas com igual mistura de polimerização. Esse fato também leva à conclusão de que, se o monolito não se encontra com estrutura uniforme ao longo da coluna, há uma variação na quantidade de poros e, portanto, na quantidade de área disponível para a interação com os analitos. Dessa maneira, quantidades diferentes de equilíbrios analito-fase estacionária podem ser estabelecidos ao longo da coluna, gerando valores de eficiência de separação distintos entre colunas preenchidas com fases de mesma composição. De acordo com Courtois et al. [155], a eficiência é altamente dependente da homogeneidade do leito monolítico - daí a importância de leitos homogêneos serem formados em colunas de mesma composição de monolito. O leito será mais homogêneo quanto mais estreita for a distribuição de macroporos, ou seja, quanto menores forem os macroporos. Tal fato converge para a conclusão formulada por

Umemura *et al.* [135]: glóbulos menores facilitam a formação de leitos uniformes ao longo da coluna monolítica, embora esta situação prejudique sua permeabilidade.

Segundo Mohr *et al.* [137], a forte dependência da morfologia do material monolítico com a composição da mistura de polimerização torna desafiadora a produção reprodutível de monolitos poliméricos, induzindo ao pensamento de que mais parâmetros precisam ser observados e controlados durante a síntese da fase a fim de que sua repetibilidade seja melhorada.

As Figuras 106 a 121 mostram as fotomicrografias obtidas para as colunas preparadas em duplicata durante o estudo de repetibilidade de síntese. As fotomicrografias estão ampliadas em 1200 vezes e cada uma delas representa uma região diferente da mesma coluna capilar.



Figura 106. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (80% solventes porogênicos, 13000 pratos m⁻¹).



Figura 107. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar G2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (80% solventes porogênicos, 15000 pratos m⁻¹).



Figura 108. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (75% solventes porogênicos, 14000 pratos m⁻¹).



Figura 109. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (75% solventes porogênicos, 50000 pratos m⁻¹).



Figura 110. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (71% solventes porogênicos, 31000 pratos m⁻¹).



Figura 111. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar B2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (71% solventes porogênicos, 11600 pratos m⁻¹).



Figura 112. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (69% solventes porogênicos, 31000 pratos m⁻¹).



Figura 113. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar C2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (69% solventes porogênicos, 18000 pratos m⁻¹).



Figura 114. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (67% solventes porogênicos, 12000 pratos m⁻¹).



Figura 115. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar A2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (67% solventes porogênicos, 20000 pratos m⁻¹).



Figura 116. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (65% solventes porogênicos, 33000 pratos m⁻¹).



Figura 117. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar D2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (65% solventes porogênicos, 30000 pratos m⁻¹).



Figura 118. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (63% solventes porogênicos, 19500 pratos m⁻¹).



Figura 119. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar E2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (63% solventes porogênicos, 31000 pratos m⁻¹).



Figura 120. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F1 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (60% solventes porogênicos, 14500 pratos m⁻¹).



Figura 121. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar F2 em duas regiões diferentes do leito cromatográfico (60% solventes porogênicos, 32000 pratos m⁻¹).

observadas, as fotomicrografias Ao serem atentamente exibidas anteriormente mostram que apenas os leitos cromatográficos relativos às colunas G1, G2, D1 e D2 (Figuras 106, 107, 116 e 117) se formaram de maneira uniforme, além de serem semelhantes estruturalmente entre colunas de mesma composição. Essa observação é coerente com os valores de eficiência de separação determinados para cada coluna capilar. Em outras palavras, as colunas G1 e G2 apresentaram eficiência similar (13200 pratos m⁻¹ e 14800 pratos m⁻¹, respectivamente), o que indica que número semelhante de equilíbrios analito-fase estacionária foi estabelecido ao longo de cada coluna e, consequentemente, a estrutura do monolito se formou ao longo do capilar de maneira uniforme, o que pode ser verificado com as fotomicrografias das Figuras 106 e 107. Mais que isso, a aparência estrutural entre essas duas figuras é muito similar, com glóbulos de mesmo tamanho distribuídos uniformemente pela seção transversal.

A mesma afirmação pode ser formulada para as colunas D1 e D2, que também tiveram eficiências de separação similares (32700 pratos m⁻¹ e 30000 pratos m⁻¹, respectivamente). Ou seja, a aparência estrutural do monolito
em diferentes regiões das duas colunas mostrou-se, individualmente, semelhante, indicando que a formação do leito ocorreu de forma uniforme. A aparência do monolito entre as duas colunas de mesma composição também foi similar, justificando o fato de as eficiências de separação serem equivalentes – quantidades semelhantes de equilíbrios analito-fase estacionária ocorreram em cada uma das colunas.

O contrário foi observado para as demais colunas capilares. Para estas, a aparência estrutural do material monolítico não se mostrou semelhante em cada região da mesma coluna. Muitas apresentaram, ainda, seções em que houve falha no ancoramento do monolito, a exemplo de H1, B1, A2, E1, F1 e F2 (Figuras 108, 110, 115, 116, 120, e 121). Em outras seções, o aspecto globular do monolito não foi observado, como em B2, A2 e E1 (Figuras 111, 115 e 118). Outras colunas apresentaram outros tipos de diferença estrutural, caso da coluna C1 (Figura 112), em que, em uma dada seção, os glóbulos são muito pequenos, ao contrário da outra região mostrada pela fotomicrografia, em que são maiores. Enfim, para estas colunas, não houve homogeneidade na formação do material monolítico, nem ao longo de um mesmo leito, nem entre monolitos de mesma composição, fato que reflete a falta de repetibilidade na eficiência entre colunas de mesma composição.

4.2.3.2. Fases estacionárias de mesma composição polimérica

A fim de avaliar a repetibilidade de síntese de uma mesma composição de fase estacionária, prepararam-se mais oito colunas de determinada composição.

Com base no maior valor de eficiência obtido para a coluna H2 e na alta área superficial da fase estacionária de mesma composição, H (3,77 m² g⁻¹), decidiu-se sintetizar oito colunas de composição H – H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 e H10. Juntamente com as já sintetizadas H1 e H2, obtiveram-se dez colunas capilares com fase estacionária de mesma composição. As colunas foram sintetizadas de duas em duas, ou seja, em pares no mesmo dia – H1 e H2, H3 e H4, H5 e H6, H7 e H8, H9 e H10. Cada coluna foi preenchida com a mistura de polimerização com

o auxílio da bomba seringa a 20 mL h⁻¹, e avaliada eletroforeticamente e por microscopia eletrônica de varredura. Cinco fases estacionárias de composição H (H11, H12, H13, H14 e H15), preparadas em um único dia, também foram avaliadas por porosimetria.

4.2.3.2.1. Caracterização eletroforética

As colunas capilares foram avaliadas eletroforeticamente da mesma forma que as demais colunas descritas neste trabalho, ou seja, foram inicialmente condicionadas com solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 30:70 v/v até a obtenção da linha de base estável. Os parâmetros cromatográficos foram calculados para cada coluna de composição H e estão reunidos na Tabela 15.

				9					
Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / % v/v	<i>N</i> * / pratos	<i>N/L_{ef} /</i> pratos m ⁻¹	RSD** / %	Η / μm	<i>k</i> *	L _{ef} / cm	Tempo de análise / min	Pressão máxima / bar
H1	_	3000	13800	17	74	1,9	23,0	5,5	80
H2		28000	50000	12	20	2,1	56,0	28,0	80
H3		20400	33000	18	31	2,3	62,0	33,0	80
H4		-	-	-	-	-	40,0	-	140
H5		14800	18700	13	54	2,6	79,0	55,0	70
H6	25:75	12200	16300	21	64	2,6	75,0	52,0	150
H7		2100	5800	16	173	3,2	36,0	50,0	70
H8		7800	9800	17	104	1,6	80,0	45,0	70
H9		10800	20000	26	52	3,0	54,0	30,0	150
H10		19000	28300	19	36	3.1	67.0	50.0	80

Tabela 15. Parâmetros cromatográficos das colunas de composição H.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

* calculado para o pentilbenzeno.

** estimativa do desvio padrão relativo.

Em uma análise da Tabela 15, nota-se a falta de repetibilidade na eficiência de separação, como já discutido em item anterior. Novamente, a falta de repetibilidade na eficiência se deve ao fato de que esta não depende apenas da retenção dos solutos, mas, principalmente, da uniformidade do material monolítico

ao longo do capilar, o que determina a quantidade de equilíbrios que podem ser estabelecidos entre analitos e fases móvel e estacionária.

Sabendo que cada avaliação eletroforética conduziu-se em triplicata, foi calculado o RSD corrida a corrida, que aparece na Tabela 15. Os valores obtidos foram altos, todos acima de 10%, porém menores que 20%, o que pode ser considerado aceitável (com exceção da coluna H9).

A coluna capilar H4 não foi testada por causa da instabilidade na linha de base e na corrente elétrica, mesmo após muito tempo de condicionamento em bomba de HPLC. Essa coluna, assim como a F (cuja avaliação foi discutida em outro momento), deve apresentar alta heterogeneidade estrutural ao longo do leito monolítico, com regiões de muitos microporos. A falta de macroporos nessas regiões comprometeu a permeabilidade da coluna, impedindo o fluxo de fase móvel e, consequentemente, sua avaliação eletroforética.

Segundo Buszewski e Szumski [27], uma das formas de avaliar a homogeneidade ao longo do leito monolítico é por meio da determinação de eficiência e seletividade de separação. Se esses dois parâmetros forem iguais para colunas de mesma composição, pode-se afirmar que há forte evidência de que o monolito se formou e se distribuiu de forma uniforme ao longo de toda a coluna. Este fato não foi observado para as fases estacionárias sintetizadas neste trabalho, como mostra a Tabela 15, devido aos diferentes valores de eficiência obtidos.

Com o objetivo de ter um desvio dos valores de eficiência obtidos para as colunas de mesma composição, calculou-se o RSD para as nove colunas testadas, tendo um valor médio para eficiência de 21800 pratos m⁻¹, com RSD de 62%. Este alto valor de estimativa de desvio padrão relativo indica a falta de repetibilidade de coluna a coluna para a eficiência, já que houve variação maior que a metade de seu valor médio. O valor calculado para RSD destoa dos valores considerados aceitáveis indicados na literatura, que não ultrapassaram 10% [19,55,107,138,195], inclusive no trabalho de Kositarat *et al.* [138], cujo monolito foi feito com os mesmos reagentes, mas com o uso do álcool isoamílico no lugar de álcool amílico. No trabalho de Eeltink *et al.* [141], o RSD correspondente à

altura de prato suplantou a marca de 20% e foi considerado inadequado – mesmo assim, é um valor menor e distante dos 62% determinados neste trabalho.

De acordo com Kele e Guiochon [195], problemas em termos de repetibilidade da uniformidade do monolito ao longo do leito são muito mais comuns que aqueles relacionados à química de superfície. Estes estão mais ligados à seletividade de separação e, neste trabalho, se mostraram similares, indicando repetibilidade em termos de hidrofobicidade, como pode ser visto no item 4.2.3.2.1.1. Segundo estes autores, medidas adequadas de RSD para a eficiência de analitos neutros ficam na faixa de 4 a 6%. Inicialmente, eles consideram que as flutuações em valores de eficiência se devem a variações na quantidade de amostra injetada. Porém, se esta quantidade for a mesma para todas as colunas, as flutuações em número de pratos podem ser explicadas por um efeito cumulativo de diversos fatores experimentais, tais como as diferenças de densidade e forma de recheio ao longo do leito; diferenças em área superficial disponível para interação com os analitos; e, principalmente, diferenças em propriedades químicas de superfície, que podem variar de acordo com a mistura reacional que preenche cada coluna capilar. De gualquer forma, é muito importante o estudo da repetibilidade em termos de eficiência de separação, já que este é um fator que pode tornar rotineiro o uso de fases estacionárias em colunas capilares. Além disso, esse tipo de estudo é mais interessante para a avaliação do desempenho da coluna do que a determinação de repetibilidade de pressão, de tempo e de fator de retenção, realizada por muitos grupos de pesquisa [119,122,126,128,133,135,137,141]. Destes trabalhos, apenas Umemura et al. [135] alcançou 25% de RSD para pressão e fator de retenção e, segundo eles, essa pequena repetibilidade se deve à iniciação térmica da reação, que dificulta a obtenção de um polímero homogêneo. Outros, como Walsh et al. [121], calcularam a repetibilidade do fator de separação (determinante da seletividade) e da resolução, sendo que para o primeiro, o RSD foi menor que 1%, enquanto que para a resolução não atingiu 10%. Mohr et al. [137] calcularam a repetibilidade de tempo de retenção e largura de pico, obtendo valores para RSD na faixa de 5 a 20%, considerados aceitáveis pelo grupo.

A eficiência de separação, como vista na introdução deste trabalho, depende do processo de transferência de massa que ocorre ao longo do leito monolítico e, este, por sua vez, é altamente ligado à sua medida da heterogeneidade [27], o que a mantém como uma missão desafiadora para a maioria dos grupos de pesquisa [195].

A Tabela 16 mostra os parâmetros eletroforéticos determinados para as colunas sintetizadas nesta etapa.

	Tabela 10. Farametros eletrororeticos das columas de composição n.					
Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / % v/v	Campo elétrico (<i>E</i>) / V cm ⁻¹	Velocidade do EOF (v_{eo}) / cm min ⁻¹	$\begin{array}{l} \text{Mobilidade do} \\ \text{EOF} \left(\mu_{eo} \right) / 10^{-3} \\ \text{cm}^2 \ \text{V}^{-1} \ \text{min}^{-1} \end{array}$		
H1		968	14,25 ± 0,03	14,72 ± 0,03		
H2		469	6,53 ± 0,06	13,9 ± 0,1		
H3		429	6,45 ± 0,05	15,1 ± 0,1		
H4		-	-	-		
H5		345	5,18 ± 0,05	$15,0 \pm 0,1$		
H6	25:75	361	5,28 ± 0,02	14,62 ± 0,06		
H7		682	$3,0 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,4$		
H8		341	4,91 ± 0,07	14,4 ± 0,2		
H9		484	$7,35 \pm 0,05$	15,2 ± 0,1		
H10		400	$5,84 \pm 0,08$	$14,6 \pm 0,2$		

Tabela 16. Parâmetros eletroforéticos das colunas de composição H.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Com exceção do valor de mobilidade de fluxo eletrosmótico encontrado para a coluna H7, os demais estão na faixa de 14 e 15×10⁻³ cm² V⁻¹ min⁻¹, indicando que a quantidade de carga negativa geradora de EOF na superfície da fase monolítica pode ser considerada constante para todas as fases. A constatação é coerente com o fato de que todas foram preparadas com a mesma composição de mistura de polimerização. Os eletrocromatogramas obtidos das colunas H3, H5, H6, H7, H8, H9 e H10 estão nas Figuras 122, 123, 124, 125, 126, 127 e 128.



Figura 122. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H3 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 123. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H5 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 124. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H6 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 125. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H7 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 126. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H8 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 127. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H9 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.



Figura 128. Eletrocromatograma da mistura de alquilbenzenos no capilar H10 (1. Tioureia; 2. Etilbenzeno; 3. Propilbenzeno; 4. Butilbenzeno; 5. Pentilbenzeno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 30:70 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 220 nm; temperatura: 25 °C.

Observando os eletrocromatogramas, notam-se diferenças no formato dos picos dos analitos separados, que são mais estreitos e resolvidos quanto maior é a eficiência de separação apresentada pela coluna em questão.

4.2.3.2.1.1. Hidrofobicidade das fases estacionárias

A seletividade metilênica também foi determinada para as fases estacionárias preparadas com a mesma composição de mistura de polimerização, a fim de que fossem observadas possíveis diferenças em relação à hidrofobicidade – mais um parâmetro para avaliar a repetibilidade de síntese das fases monolíticas, conforme afirmam Deyl e Svec [38] em seu trabalho.

A Tabela 17 contém os valores de seletividade metilênica para cada fase estacionária de composição H.

Capilar	Monômeros: solventes porogênicos / % v/v	log α	α	Coeficiente de determinação
H1		0,1476	1,4049	0,9998
H2		0,1497	1,4115	0,9998
H3		0,1482	1,4068	0,9998
H4		-	-	-
H5	25:75	0,1508	1,4152	0,9998
H6		0,1518	1,4184	0,9998
H7		0,1647	1,4610	0,9998
H8		0,1367	1,3698	0,9998
H9		0,1589	1,4418	0,9998
H10		0,1584	1,4403	0,9998

Tabela 17. Seletividade metilênica das colunas de composição H.

Obs.: -: Impossibilidade de avaliação eletroforética.

Os valores de correlação foram maiores que 0,999, indicando alta seletividade para analitos aromáticos hidrofóbicos, como alquilbenzenos. Os valores de α ficaram ao redor de 1,4, dentro da faixa esperada [194] para todas as fases, o que implica na semelhança de caráter hidrofóbico entre todas as fases monolíticas.

Os valores obtidos para α foram semelhantes aos de colunas particuladas exibidos no trabalho de Moravcová *et al.* [134]. Tal fato indica que essas fases monolíticas apresentaram hidrofobicidade similar à das colunas recheadas por partículas de sílica com grupos apolares, promovendo, assim, separações de analitos geralmente separados por fases particuladas [1] (exemplos são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), que foram alvos de separação da coluna H3, uma das mais eficientes, a ser mostrada na seção 4.2.5).

Mais uma vez, as pequenas diferenças observadas entre os valores de seletividade se devem às diferenças de morfologia estrutural do monolito ao longo do seu leito, como será mostrado pelas fotomicrografias obtidas por SEM. Isso se reflete no fenômeno de transferência de massa que ocorre no interior da coluna, que não é constante ao longo da mesma. Esta mesma explicação pode ser aplicada para justificar as diferentes mobilidades de EOF observadas para as colunas, como consta da Tabela 16.

4.2.3.2.2. Caracterização físico-química

4.2.3.2.2.1. Porosimetria

Da mesma forma que outras amostras de fases estacionárias já analisadas anteriormente, as fases de composição H foram preparadas em um único dia para que houvesse a menor variação possível de parâmetros experimentais e de ambiente. Os valores de área superficial e volume de poro para essas amostras estão na Tabela 18.

Fase estacionária	M Solventes	onômeros : porogênicos / % v/v	Área superficial	Volume de poro / 10 ⁻³ cm ³
	Monômeros	Solventes porogênicos	/ m- g -	g ⁻¹
H11			2,99	5,11
H12		75	3,27	4,91
H13	25		3,65	5,46
H14			4,00	6,07
H15			4,11	6,49

 Tabela 18. Parâmetros de poros para as amostras de material monolítico de composição H.

A partir dos valores obtidos para a área superficial e o volume de poro, calculou-se a média e sua respectiva estimativa de desvio padrão relativo (RSD) para cada um dos parâmetros. Para a área superficial, obteve-se 3,60 m² g⁻¹, com variação de 13%. Para o volume de poro, o valor médio calculado foi $5,6 \times 10^{-3}$ cm³ g⁻¹, com variação de 12%. O valor médio de área de superfície específica é próximo ao valor encontrado para a amostra H, preparada no mesmo dia em que as demais amostras feitas a partir da variação da proporção entre monômeros e solventes porogênicos, cujo valor foi de 3,77 m² g⁻¹. No entanto, ao observar a Tabela 18, nota-se que foram determinados diferentes valores de área de superfície para cinco materiais preparados em um mesmo dia e de mesma composição, o que confirma que diferentes valores de parâmetros estruturais são obtidos quando os materiais apresentam heterogeneidade na estrutura monolítica.

É interessante notar que os valores obtidos para a área superficial não foram aleatórios: seguiram uma tendência de aumento no valor partindo de H11 para H15, em ordem numérica. Sabe-se que, no dia do preparo dessas amostras, elas foram feitas seguindo a ordem numérica, iniciada pela H11 e terminada pela H15. A diferença de tempo entre o preparo de cada uma delas ficou em torno de 10 min. Em outras palavras, a primeira solução preparada, H11, permaneceu por mais tempo com os monômeros, os solventes porogênicos e o agente iniciador do que a última, H15. Sabe-se que o agente iniciador começa a se decompor em temperatura ambiente, e alcança a maior taxa de decomposição ao redor de 60 ºC [196]. Ao se decompor, gera gás nitrogênio, conforme mostrou a reação da Figura 8. Este gás tenta, provavelmente, encontrar em toda a reação um caminho de escape por meio do material monolítico e torna-se, assim, um dos responsáveis pela formação de macroporos maiores. Dessa forma, quanto mais tempo a reação libera o gás, mais macroporos devem se formar, o que diminui a quantidade de micro e mesoporos e, consequentemente, a área de superfície específica. A amostra da fase estacionária H11, que permaneceu por mais tempo sob condições reacionais, deve apresentar, portanto, mais macroporos. Por isso, determinou-se um menor valor de área superficial em relação à amostra H15, cujo tempo de reação foi menor, ou seja, liberou-se menor quantidade de gás antes da ativação térmica, o que provocou a formação de menos macroporos e mais micro e mesoporos, refletindo em maior valor de área superficial.

As isotermas obtidas para as amostras H11, H12, H13, H14 e H15 estão nas Figuras 129, 130, 131, 132 e 133.



Figura 129. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H11.



Figura 130. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H12.



Figura 131. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H13.



Figura 132. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H14.



Figura 133. Isoterma de adsorção-dessorção da fase estacionária H15.

As curvas de distribuição de tamanho de poro para as fases sintetizadas H11, H12, H13, H14 e H15 estão nas Figuras 134, 135, 136, 137 e 138.



Figura 134. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H11.



Figura 135. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H12.



Figura 136. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H13.



Figura 137. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H14.



Figura 138. Curva de distribuição de poros da fase estacionária H15.

Tanto as isotermas quanto as curvas de distribuição de tamanho de poros mostraram perfis semelhantes às demais fases analisadas neste trabalho, e constituem um material que apresenta, essencialmente, micro e mesoporos em sua constituição. A maior parte dos mesoporos presentes revelam tamanho na faixa entre 2 e 20 nm.

4.2.3.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias para essas colunas capilares de mesma composição foram obtidas de regiões diferentes do leito de cada coluna. As duas fotomicrogafias à esquerda representam essas regiões diferentes; a da direita é uma ampliação da imagem vizinha.

As Figuras 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145 e 146 apresentam as fotomicrografias relativas às colunas H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 e H10.



Figura 139. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H3 (33000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 140. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H4. Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 141. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H5 (19000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 142. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H6 (16000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 143. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H7 (5800 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 144. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H8 (10000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 145. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H9 (20000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.



Figura 146. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do capilar H10 (28000 pratos m⁻¹). Primeira e segunda: à esquerda, ampliação de 1200 vezes e terceira: à direita, ampliação de 5000 vezes.

Analisando as fotomicrografias das colunas capilares de composição 25:75 v/v monômeros:solventes porogênicos, inclusive as Figuras 108 e 109 (relativas aos capilares H1 e H2, respectivamente), é possível observar que todas apresentam os monolitos como estruturas ricas em glóbulos variáveis em tamanho. Tomando as Figuras 141 e 142 como exemplo, os glóbulos presentes na coluna H5 são muito menores que os da coluna H6, e as duas colunas foram preenchidas com a mesma mistura, no mesmo dia. Desse modo, pode-se afirmar que, partindo da mesma mistura de polimerização, é possível gerar monolitos no interior de uma coluna com características morfológicas diferentes, o que ocasiona eficiências de separação distintas. Pequenas diferenças de tamanho dos glóbulos no interior do capilar são suficientes para gerar diferenças significativas na estrutura polimérica, afetando diretamente a eficiência cromatográfica, que depende da área de superfície da fase estacionária disponível para interagir com os analitos e do processo de transferência de massa ao longo da coluna.

Ao comparar as fotomicrografias das Figuras 139e 140, relativas às colunas H3 e H4, respectivamente, nota-se uma grande semelhança na aparência estrutural dos monolitos e no tamanho dos glóbulos. Porém, ao longo do leito, esta semelhança não poderia ser observada, já que, provavelmente, o leito da coluna H4 seja heterogêneo e contenha os muitos microporos que comprometeram a permeabilidade da coluna e, consequentemente, impediram sua avaliação eletroforética.

Da mesma forma que no item 4.2.3.1.2.2, conclui-se que faltou repetibilidade na síntese dessas fases estacionárias, tornando impossível relacionar o maior ou o menor tamanho dos glóbulos com a eficiência de separação. Tal impedimento confirma que a eficiência de separação depende de outros fatores [38] e, principalmente, da homogeneidade [155] ao longo do leito cromatográfico – parâmetro que se encontra fora de controle do operador durante a síntese do material polimérico.

A falta de repetibilidade observada não só pelas fotomicrografias, mas também pelos resultados porosimétricos obtidos a partir de amostras preparadas em um único dia e de mesma composição, pode ser explicada ao se levar em conta que o agente iniciador da reação de termopolimerização foi o AIBN. Xu et al. [196] estudaram a decomposição deste reagente em temperatura ambiente e afirmaram que a máxima taxa de decomposição ocorre a 64 ºC (temperatura próxima à reação de termopolimerização realizada). Porém, a decomposição ocorre em temperaturas menores, sendo que a 25 ºC, embora a taxa seja pequena, o AIBN está se decompondo e, em condições propícias na presença de monômero, a reação de polimerização acontece. Em outras palavras, a partir do momento em que o agente iniciador é adicionado à mistura de polimerização, a reação se inicia e o polímero começa a se entrecruzar e a formar núcleos. Com isso, ao preencher uma coluna capilar com o líquido precursor, pode-se afirmar que as características morfológicas da região final do capilar não são exatamente iguais às da região inicial. E a segunda coluna a ser preenchida (no caso de um preenchimento de duas colunas com a mesma mistura de polimerização em um mesmo dia) já não apresenta o líquido precursor com as mesmas características da primeira preenchida. Assim, ao colocar as colunas no forno para iniciar a termopolimerização em temperatura controlada de 60 ºC, é possível afirmar que os monolitos formados no interior de cada capilar apresentam morfologias

diferentes entre si e ao longo de cada um dos leitos cromatográficos. Afinal, cada capilar foi preenchido em momentos diferentes, em que a polimerização, mesmo em pequena taxa, já prosseguia.

Observando a reação representada na Figura 8, nota-se, também, que a decomposição do AIBN libera gás nitrogênio como um dos produtos, além dos radicais livres que são essenciais para a formação e o entrecruzamento das cadeias poliméricas. Uma vez formadas moléculas de gás, estas devem ser expelidas do material, contribuindo para a formação dos macroporos. Para tanto, buscam-se espaços entre os domínios monolíticos que funcionem como regiões de escape de gás. Este fato explica, provavelmente, a formação de "buracos" e de massas irregulares ao longo da coluna, como mostram as Figuras 108, 109, 110, 115, 118, 121 e 144.

De acordo com um recente trabalho de Nischang et al. [149], o mecanismo pelo qual a reação de polimerização acontece é o parâmetro mais importante para explicar a falta de homogeneidade do leito monolítico, além das considerações feitas acerca do uso e da decomposição de AIBN. A reação de polimerização apresenta, basicamente, cinco importantes etapas: iniciação, polimerização, nucleação, formação dos glóbulos e separação de fases. Todas elas são de complexa compreensão e essenciais para a interpretação da estrutura porosa do material monolítico. Segundo esses autores, os materiais formados por copolimerização por formação de radicais livres são geralmente heterogêneos, pois o agente de entrecruzamento deve ter, ao menos, duas ligações duplas e, se estas apresentarem igual reatividade, a taxa de consumo do agente será o dobro da taxa de consumo do monômero precursor (monovinil). Consequentemente, as moléculas de entrecruzador são incorporadas muito mais rapidamente às cadeias do polímero em crescimento do que as moléculas do monômero precursor, fazendo com que a rede polimérica final apresente uma distribuição de densidade de monômero entrecruzador. As redes que são formadas primeiramente no meio têm maior quantidade de entrecruzador incorporada que as redes que se formam no final da reação. Assim, as primeiras redes formadas são caracterizadas por alta densidade de recheio. As moléculas de monômero de entrecruzamento que

permanecem no meio reacional modificam sua reatividade conforme ocorre a incorporação de outras, de mesma função, ao copolímero que vem sendo criado. Essa diferença em reatividade entre os monômeros de entrecruzamento, conforme a reação prossegue, complica a cinética de reação e aumenta a tendência de o leito monolítico em formação apresentar diferentes densidades de recheio e aspecto globular, gerando leitos monolíticos não homogêneos espacialmente [109,149].

Os motivos expostos anteriormente podem explicar, portanto, a falta de repetibilidade na síntese das fases estacionárias monolíticas, originando leitos não uniformes estruturalmente e capazes de estabelecer diferentes quantidades de equilíbrios com os analitos, o que caracteriza a falta de repetibilidade na eficiência de separação.

4.2.4. Separação de o-terfenil, pentilbenzeno e trifenileno

Como forma de aplicação das fases monolíticas do tipo C18, três compostos foram separados com a coluna H6, com diferentes estruturas químicas, sendo o trifenileno e o *o*-terfenil diferindo apenas em caráter espacial. As estruturas químicas dos três analitos estão na Figura 147.



Figura 147. Fórmulas estruturais de: 1. O-terfenil; 2. Pentilbenzeno; 3. Trifenileno.

A fase móvel utilizada para tal separação foi a solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 35:65 v/v e o eletrocromatograma obtido está na Figura 148. Cada analito foi identificado por injeção individual.



Figura 148. Eletrocromatograma da mistura de 3 analitos com tioureia no capilar H6 (1. Uracil; 2. *O*-terfenil; 3. Pentilbenzeno; 4. Trifenileno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 35:65 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 254 nm; temperatura: 25 °C.

A separação entre o *o*-terfenil e o trifenileno indicou que a fase monolítica apresenta adequada seletividade estérica, já que estes dois analitos revelam estruturas similares mas com diferenças na disposição espacial.

4.2.5. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH)

Por causa da alta seletividade obtida na separação de PAH pela coluna 2, preparada na etapa em que variaram-se o tipo e a proporção de solventes porogênicos, decidiu-se separar esses analitos altamente hidrofóbicos nas melhores colunas sintetizadas pela variação na proporção entre monômeros e solventes porogênicos, com maior seletividade metilênica. A coluna mais eficiente foi a H2, com 50000 pratos m⁻¹. No entanto, sua fase estacionária não entrou em equilíbrio de forma adequada com a fase móvel utilizada para tal separação. Assim, a coluna H3, com 33000 pratos m⁻¹ foi escolhida para separar 11 PAH.

A coluna H3 foi condicionada com fase móvel composta por solução tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0:acetonitrila 40:60 v/v, e a força cromatográfica foi otimizada a fim de que uma alta resolução entre os picos fosse obtida.

A Figura 149 mostra o eletrocromatograma obtido para a mistura de 11 padrões de PAH na coluna capilar H3.



Figura 149. Eletrocromatograma da mistura de 11 PAH com tioureia no capilar H3 (1. Tioureia; 2. Naftaleno; 3. Acenaftileno; 4. Fluoreno; 5. Acenafteno; 6. Fenantreno; 7. Antraceno; 8. Fluoranteno; 9. Pireno; 10. Benzo[a]antraceno; 11. Benzo[b]fluoranteno; 12. Benzo[a]pireno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 40:60 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 228 nm; temperatura: 25 °C.

Uma mistura comercial composta por 16 PAH foi obtida em metanol:diclorometano 1:1 v/v e injetada na coluna capilar H3, mantendo-se a mesma força cromatográfica presente na separação dos padrões. A Figura 150 mostra o eletrocromatograma obtido na separação dessa mistura.



Figura 150. Eletrocromatograma da mistura de 16 PAH com tioureia no capilar H3 (1. Tioureia; 2. Naftaleno; 3. Acenaftileno; 4. Fluoreno; 5. Acenafteno; 6. Fenantreno; 7. Antraceno; 8. Fluoranteno; 9. Pireno; 10. Criseno; 11. Benzo[a]antraceno; 12. Benzo[b]fluoranteno; 13. Benzo[k]fluoranteno; 14. Dibenzo[a,h]antraceno;
15. Benzo[a]pireno; 16. Indeno(1,2,3-CD)pireno; 17. Benzo(g,h,i)perileno). Condições eletroforéticas: eletrólito suporte: tampão Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8,0 / acetonitrila 40:60 v/v; injeção: 10 kV por 5 s; corrida: 30 kV; detecção: 254 nm; temperatura: 25 °C.

A ordem de eluição dos analitos foi estabelecida de acordo com o tempo de migração daqueles que tinham padrão e, dos demais, de acordo com sua fórmula estrutural. A Figura 44 apresenta as fórmulas estruturais de 12 PAH. A Figura 151 mostra as fórmulas estruturais dos outros quatro PAH presentes na mistura comercial.



Figura 151. Fórmulas estruturais de 4 PAH. 1. Benzo[k]fluoranteno; 2. Dibenzo[a,h]antraceno; 3. Indeno(1,2,3-CD)pireno; 4. Benzo(g,h,i)perileno.

5. CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível desenvolver colunas monolíticas que permitiram a separação de compostos apolares, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), já que o monômero precursor para o preparo da fase estacionária foi o octadecilmetacrilato (C18), grupo altamente apolar.

Foram determinados os parâmetros estruturais de todas as fases estacionárias sintetizadas. E notou-se que um maior valor de área superficial foi observado quanto maior era a proporção de 1,4-butanodiol na composição dos solventes porogênicos. Tal fato está de acordo com o que se observou em SEM, em que se reduziu a quantidade de macroporos nesse mesmo sentido, supondo aumento em micro e mesoporos responsáveis pela alta área superficial. Notou-se, também, uma maior área superficial para aqueles preparados com maior proporção de solventes porogênicos em relação aos monômeros, o que também está de acordo com as fotomicrografias obtidas para cada coluna.

A variação na proporção e no tipo de solventes porogênicos, bem como na proporção de monômeros em relação a estes últimos, permitiu controlar a morfologia do material monolítico e dos parâmetros porosimétricos, como a área superficial e o volume de poro. A variação no tipo e na proporção de solventes porogênicos forneceu, ainda, um controle mais fino e preciso sobre as propriedades porosas, já que diferenças mais significativas foram observadas nas fotomicrografias obtidas para essas colunas por SEM, e pôde-se relacionar o aspecto estrutural e morfológico do monolito com a eficiência de separação cromatográfica e com os parâmetros obtidos por porosimetria. A eficiência de separação foi, assim, controlada pelo tamanho dos poros do material monolítico nesta etapa do trabalho. Essa relação com a eficiência de separação não pôde ser estabelecida para as colunas preparadas por variação na proporção entre monômeros e solventes porogênicos, já que as diferenças estruturais entre os diferentes materiais monolíticos foram muito mais sutis.

Ao serem analisados os resultados porosimétricos e aqueles obtidos por microscopia eletrônica de varredura, concluiu-se que o material monolítico

sintetizado a partir de octadecilmetacrilato apresentou três tipos de poros diferenciados pelo tamanho: micro, meso e macroporos.

Mesmo com a mínima variação possível de parâmetros experimentais, não foi possível reproduzir as fases estacionárias das colunas monolíticas. O mesmo material polimérico foi utilizado para rechear, paralelamente, duas colunas. Ao todo, 10 colunas foram recheadas, obtendo-se valores de eficiência de separação muito diferentes, com RSD de 62%. A falta de repetibilidade na eficiência se refletiu na ausência de homogeneidade da estrutura globular monolítica ao longo do leito da maioria das colunas preparadas. A homogeneidade na morfologia estrutural é essencial para que se estabeleça uma transferência de massa constante ao longo da coluna e para que não haja variação na quantidade de equilíbrios entre analito e fase estacionária em colunas de mesma composição.

A ausência de repetibilidade de preparo pode ser justificada pela reação de copolimerização, que ocorre na presença de AIBN como agente iniciador e cuja decomposição se inicia tão logo este é adicionado à mistura reacional. Dessa forma, não houve controle sobre o processo de formação do polímero nos diferentes frascos de reação, o que dificultou o alcance da repetibilidade de preparo desses materiais.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Até o momento, há poucos estudos sobre a aplicação de monolitos poliméricos como fase estacionária para a separação de pequenas moléculas. Segundo Lubbad e Buchmeiser [133], quando os grupos de pesquisa conseguem sintetizar monolitos poliméricos aptos para separar estes pequenos analitos, encontra-se uma limitação referente à repetibilidade de preparo do material monolítico. Essa repetibilidade foi um dos grandes alvos de estudo neste trabalho, já que os monolitos sintetizados apresentaram micro e mesoporos na sua constituição e, consequentemente, mostraram adequada seletividade na separação de alquilbenzenos e alquilparabenos, que são analitos muito pequenos.

Com este estudo, percebeu-se que o fator mais importante a ser considerado é a reação de copolimerização responsável pela formação do monolito orgânico polimérico. A partir do momento em que se adiciona o agente iniciador, a reação se inicia e, assim, diferentes frascos de reação se encontrarão em estágios distintos de reação quando forem aquecidos em uma determinada temperatura. Dessa maneira, a reação não tem controle.

Estudos sobre a possibilidade de promover a reação de copolimerização na ausência de agente iniciador devem ser desenvolvidos. O próprio agente de entrecruzamento, que contém pelo menos duas ligações duplas, seria o responsável pela formação dos radicais livres, essenciais para ligar partes independentes formadoras do polímero. Este seria formado e a reação se iniciaria tão somente no momento em que a mistura reacional fosse submetida ao aquecimento em dada temperatura. Em todos os frascos de reação, ela começaria ao mesmo tempo e terminaria no mesmo instante. Desse jeito, é provável que se alcance um maior controle sobre a reação radicalar e, consequentemente, que se formem monolitos de forma reprodutível.

Este tipo de estudo seria ideal para transformar CEC em uma técnica de separação de rotina, como afirmam Eeltink e Kok [44]. De acordo com estes autores, o controle sobre o preparo do monolito e, portanto, sobre a morfologia da estrutura porosa auxiliaria na obtenção de tempos de retenção repetitíveis, possibilitando a realização de análises quantitativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Krull, I. S.; Stevenson, R. L.; Mistry, K.; Swartz, M. E. Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography. An Introduction. New York: HNB Publishing, 2000.

[2] Simal-Gándara, J. The place of capillary electrochromatography among separations techniques – a review. *Anal. Chem.* <u>34</u> (2004) 85-94.

[3] Bartle, K. D.; Myers, P. **Theory of capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>916</u> (2001) 3-23.

[4] Smith, N. W.; Carter-Finch, A. S. Electrochromatography. J. Chromatogr. A 892 (2000) 219-255.

[5] Altria, K. D.; Smith, N. W.; Turnbull, C. H. A review of the current states of capillary electrochromatography technology and applications. *Chromatographia* <u>46</u> (1997) 664-674.

[6] Segato, M. P.; Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. *Quím. Nova* <u>32</u> (2009) 431-440.

[7] Cikalo, M. G.; Bartle, K. D.; Robson, M. M.; Myers, P.; Euerby, M. **Capillary** electrochromatography. *Analyst* <u>123</u> (1998) 87R-102R.

[8] Mistry, K.; Krull, I.; Grinbergn, N. Capillary electrochromatography: an alternative to HPLC and CE. J. Sep. Sci. <u>25</u> (2002) 935-958.

[9] Svec, F. **CEC: selected developments that caught my eye since the year 2000.** *Electrophoresis* <u>30</u> (2009) 568-582.

[10] Kato, M.; Onda, Y.; Sakai-Kato, K.; Toyo'oka, T. **Simultaneous analysis of cationic, anionic and neutral compounds using monolithic CEC columns.** *Anal. Bioanal. Chem.* <u>386</u> (2006) 572-577.

[11] Tanret, I.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. **Pressure-assisted CEC versus CEC using methacrylate-based monolithic columns: influence of the polymerization-mixture composition.** *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 4463-4474.

[12] Dorsey, J. G. Electrochromatography: the hope and the promise. *Microchem. J.* <u>61</u> (1999) 6-11.

[13] Knox, J. H.; Grant, I. H. Miniaturisation in pressure and electroendosmotically driven liquid chromatography – some theoretical considerations. *Chromatographia* <u>24</u> (1987) 135-143.

[14] Mould, D. L.; Synge, R. L. M. Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides – A new approach to the chromatography of large molecules. *Analyst* <u>77</u> (1952) 964-969.

[15] Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Schieke, J. D. Electro-osmosis – A new concept for high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.* <u>99</u> (1974) 23-30.

[16] Jiskra, J.; Claessens, H.; Cramers, C. A. Stationary and mobile phases in capillary electrochromatography (CEC). *J. Sep. Sci.* <u>26</u> (2003) 1305-1330.

[17] Barceló-Barrachina, E.; Moyano, E.; Galceran, M. T. **State-of-the-art of the hyphenation of capillary electrochromatography with mass spectrometry.** *Electrophoresis* <u>25</u> (2004) 1927-1948.

[18] Tavares, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Quím. Nova* <u>19</u> (1996) 173-181.

[19] Svec, F.; Peters, E. C.; Sýkora, D.; Fréchet, J. M. J. **Design of the monolithic** polymers used in capillary electrochromatography columns. *J. Chromatogr. A* <u>887</u> (2000) 3-29.

[20] Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>954</u> (2002) 5-32.

[21] Tang, Q.; Lee, M. L. Column technology for capillary electrochromatography. *Trends Anal. Chem.* <u>19</u> (2000) 648-663.

[22] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. **High-resolution separations based on** electrophoresis and electroosmosis. *J. Chromatogr.* <u>218</u> (1981) 209-216.

[23] Wan, Q. –H. Capillary electrochromatography: effect of electrolyte concentration on electroosmotic flow and column efficiency. *J. Chromatogr. A* <u>782</u> (1997) 181-189.

[24] Rathore, A. S.; Reynolds, K. J.; Colón, L. A. **Joule heating in packed capillaries used in capillary electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>23</u> (2002) 2918-2928.

[25] Szumski, M.; Buszewski, B. State of the art in miniaturized separation techniques. *Crit. Rev. in Anal. Chem.* <u>32</u> (2002) 1-46.

[26] Rathore, A. S. Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 23 (2002) 3827-3846.

[27] Buszewski, B.; Szumski, M. Study of bed homogeneity of methacrylatebased monolithic columns for micro-HPLC and CEC. *Chromatographia Supplement* <u>60</u> (2004) 261-267.

[28] Fujimoto, C. Packing materials and separation efficiencies in capillary electrochromatography. *Trends Anal. Chem.* <u>18</u> (1999) 291-301.

[29] Yan, L.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Feng, Y.; Zhang, L.; Li, T.; Zhang, Y. **Hybrid** organic-inorganic phenyl monolithic column for capillary electrochromatography. *Electrophoresis* <u>26</u> (2005) 2935-2941.

[30] Eeltink, S.; Decrop, W. M. C.; Rozing, G. P.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. Th. Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns. *J. Sep. Sci.* <u>27</u> (2004) 1431-1440.

[31] Faria, A. M.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. **Fases** estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Quím. Nova* <u>29</u> (2006) 300-309.

[32] Belenkii, B. G. Monolithic stationary phases: yesterday, today, and tomorrow. *Russ. J. Bioorg. Chem.* <u>32</u> (2006) 323-332.

[33] Freitag, R. Comparison of the chromatography behavior of monolithic capillary columns in capillary electrochromatography and nano-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1033</u> (2004) 267-273.

[34] Eeltink, S.; Desmet, G.; Vivó-Truyols, G.; Rozing, G. P.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. I. **Performance limits of monolithic and packed capillary columns in high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>1104</u> (2006) 256-262.

[35] McCalley, D. V. Comparison of conventional microparticulate and a monolithic reversed-phase column for high-efficiency fast liquid chromatography of basic compounds. *J. Chromatogr. A* <u>965</u> (2002) 51-64.

[36] Rathore, A. S.; Horváth, C. Chromatographic and electrophoretic migration parameters in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* <u>23</u> (2002) 1211-1216.

[37] Colón, L. A.; Guo, Y.; Fermier, A. **Capillary electrochromatography.** *Anal. Chem.* <u>15</u> (1997) 461A-467A.

[38] Deyl, Z.; Svec, F. **Capillary Electrochromatography.** Berkeley: Elsevier Science B.V., 2001.

[39] Pursch, M.; Sander, L. C. Stationary phases for capillary electrochromatography. J. Chromatogr. A <u>887</u> (2000) 313-326.

[40] Baltussen, E.; van Dedem, G. W. K. **Novel approach for fritless capillary electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>23</u> (2002) 1224-1229.

[41] Oguri, S.; Oga, C.; Takeda, H. Micro-magnetic particles frit for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1157</u> (2007) 304-308.

[42] Rocco, A.; Fanali, S. **Capillary electrochromatography without external pressure assistance. Use of packed columns with a monolithic inlet frit.** *J. Chromatogr. A* <u>1191</u> (2008) 263-267.

[43] Angus, P. D. A.; Demarest, C. W.; Catalano, T.; Stobaugh, J. F. **Aspects of column fabrication for packed capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>887</u> (2000) 347-365.

[44] Eeltink, S.; Kok, W. Th. **Recent applications in capillary** electrochromatography. *Electrophoresis* <u>27</u> (2006) 84-96.

[45] Eeltink, S.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Open-tubular capillary columns with a porous layer of monolithic polymer for highly efficient and fast separations in electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>27</u> (2006) 4249-4256.

[46] Pesek, J. J.; Matyska, M. I. Etched chemically modified capillaries: Novel separation media for electrophoretic analyses. *J. Sep. Sci.* <u>27</u> (2004) 1285-1291.

[47] Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Nshanian, M. **Open-tubular capillary** electrochromatography of small polar molecules using etched, chemically modified capillaries. *Electrophoresis* <u>32</u> (2011) 1728-1734.

[48] Hjertén, S.; Liao, J. L.; Zhang, R. **High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds.** *J. Chromatogr.* <u>473</u> (1989) 273-275.

[49] Svec, F.; Huber, C. G. Monolithic materials: promises, challenges, achievements. *Anal. Chem.* <u>78</u> (2006) 2101-2107.

[50] Moravcová, D.; Jandera, P.; Urban, J.; Planeta, J. **Characterization of polymer monolithic stationary phases for capillary HPLC.** *J. Sep. Sci.* <u>26</u> (2003) 1005-1016.

[51] Peters, E. C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Rigid macroporous polymer monoliths. *Adv. Mater.* <u>11</u> (1999) 1169-1181.

[52] Sáfrány, Á.; Beiler, B.; László, K.; Svec, F. Control of pore formation in macroporous polymers synthesized by single-step γ-radiation-initiated polymerization and cross-linking. *Polymer* <u>46</u> (2005) 2862-2871.

[53] Abrantes, S.; Souza, C. M. O. C. C.; Bastos, P. A.; Nery, V. C.; Silva, M. A. M. **Preparação e aplicação de coluna monolítica para eletrocromatografia capilar.** *Analytica* <u>24</u> (2006) 60-61.

[54] Bedair, M.; El Rassi, Z. **Recent advances in polymeric monolithic stationary phases for electrochromatography in capillaries and chips.** *Electrophoresis* <u>25</u> (2004) 4110-4119.

[55] Hilder, E. F.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>23</u> (2002) 3934-3953.

[56] Shkolnikov, V.; Strickland, D. G.; Fenning, D. P.; Santiago, J. G. **Design and fabrication of porous polymer wick structures.** *Sens. Actuators B* <u>150</u> (2010) 556-563.

[57] Svec, F. Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *J. Sep. Sci.* <u>27</u> (2004) 747-766.

[58] Zhang, Y.; Fan, L.; Lee, K.; Zhang, Y.; Choi, S.; Gong, W. Preparation of monolithic capillary columns for capillary electrochromatography by γ -ray irradiation. *Microchim. Acta* <u>158</u> (2007) 353-360.

[59] Li, W.; Fries, D. P.; Malik, A. Sol-gel stationary phases for electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1044</u> (2004) 23-52.

[60] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Tanaka, N. Chromatographic characterization of macroporous monolithic silica prepared via sol-gel process. *Colloids Surf. A* <u>187-188</u> (2001) 273-279.

[61] Allen, D.; El Rassi, Z. Silica-based monoliths for capillary electrochromatography: Methods of fabrication and their applications in analytical separations. *Electrophoresis* <u>24</u> (2003) 3962-3976.

[62] Zajickova, Z.; Luna, J.; Svec, F. Surface modification of silica-based monolith with poly(pentafluoropropyl methacrylate) using single step photografting. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* <u>33</u> (2010) 1640-1648.

[63] Planeta, J.; Moravcová, D.; Roth, M.; Karásek, P.; Kahle, V. Silica-based monolithic capillary columns – Effect of preparation temperature on separation efficiency. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 5737-5740.
[64] Klodzinska, E.; Moravcová, D.; Jandera, P.; Buszewski, B. **Monolithic** continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations. *J. Chromatogr. A* <u>1109</u> (2006) 51-59.

[65] Li, Y.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. Preparation of monoliths from single crosslinking monomers for reversed-phase capillary chromatography of small molecules. *J. Chromatogr. A* <u>1218</u> (2011) 1399-1408.

[66] Ou, J.; Gibson, G. T. T.; Oleschuk, R. D. Fast preparation of photopolymerized poly(benzylmethacrylate-*co*-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 3628-3634.

[67] Lin, J.; Wu, X.; Lin, X.; Xie, Z. Preparation of polymethacrylate monolithic stationary phases having bonded octadecyl ligands and sulfonate groups: Electrochromatographic characterization and application to the separation of polar solutes for pressurized capillary electrochromatography. *J. Chromatogr.* A <u>1169</u> (2007) 220-227.

[68] Lü, J.; Wang, J.; Wang, X.; Wu, X.; Lin, X.; Xie, Z. Single-step preparation and characterization of polymeric monolith for pressurized capillary electrochromatography of typical homologs. *J. Sep. Sci.* <u>30</u> (2007) 2993-2999.

[69] Bedair, M.; El Rassi, Z. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: I. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes. *Electrophoresis* <u>23</u> (2002) 2938-2948.

[70] Vlakh, E. G.; Tennikova, T. B. **Preparation of methacrylate monoliths.** *J. Sep. Sci.* <u>30</u> (2007) 2801-2813.

[71] Carbonnier, B.; Guerrouache, M.; Denoyel, R.; Millot, M. **CEC separation of aromatic compounds and proteins on hexylamine-functionalized N-acryloxysuccinimide monoliths.** *J. Sep. Sci.* <u>30</u> (2007) 3000-3010.

[72] Bedair, M.; El Rassi, Z. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: II. Preparation of cationic stearyl-acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization. *J. Chromatogr. A* <u>1013</u> (2003) 35-45.

[73] Bedair, M.; El Rassi, Z. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: III. Evaluation of the electrochromatographic retention of neutral and charged solutes on cationic stearyl-acrylate monoliths and the separation of water-soluble proteins and membrane proteins. *J. Chromatogr.* $A \underline{1013} (2003) 47-56$.

[74] Jiang, T.; Jiskra, J.; Claessens, H. A.; Cramers, C. A. **Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>923</u> (2001) 215-227.

[75] Zhang, K.; Gao, R. Y.; Yan, C.; Zhang, Z.; Wang, Q. **Preparation and porous property of C-14-monolithic column for capillary electrochromatography.** *Chromatographia* <u>61</u> (2005) 55-60.

[76] Bernabé-Zafón, V.; Cantó-Mirapeix, A.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M. Comparison of thermal and photo polymerization of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC. *Electrophoresis* <u>30</u> (2009) 1929-1936.

[77] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J. M.; Mongay-Fernández, C.; Simó-Alfonso, E. F. **Chemical initiation for butyl and lauryl acrylate monolithic columns for CEC.** *Electrophoresis* <u>30</u> (2009) 599-606.

[78] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J. M.; Mongay-Fernández, C.; Simó-Alfonso, E. F. Lauroyl peroxide as thermal initiator of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC. *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 4399-4406.

[79] Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Zigon, M.; Strancar, A. **Methacrylate** monoliths prepared from various hydrophobic monomers – Structural and chromatographic characteristics. *J. Sep. Sci.* <u>26</u> (2003) 322-330.

[80] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J. M.; Benavente, D.; Mongay-Fernández, C.; Simó-Alfonso, E. F. **Peroxodisulfate as a chemical initiator for methacrylate-ester monolithic columns for capillary electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 910-918.

[81] Zhang, Y.; Ye, X.; Tian, M.; Qu, L.; Choi, S.; Gopalan, A. I.; Lee, K. Novel method to prepare polystyrene-based monolithic columns for chromatographic and electrophoretic separations by microwave irradiation. *J. Chromatogr. A* <u>1188</u> (2008) 43-49.

[82] Rohr, T.; Yu, C.; Davey, M. H.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Porous polymer** monoliths: simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips. *Electrophoresis* <u>22</u> (2001) 3959-3967.

[83] Gu, B.; Li, Y.; Lee, M. L. Polymer monoliths with low hydrophobicity for strong cation-exchange capillary liquid chromatography of peptides and proteins. *Anal. Chem.* <u>79</u> (2007) 5848-5855.

[84] Lin, J.; Lin, J.; Lin, X.; Wu, X.; Xie, Z. Preparation of a neutral porous monolith and its evaluation in pressurized capillary electrochromatography with neutral and charged solutes. *Electrophoresis* <u>31</u> (2010) 1674-1680.

[85] Karenga, S.; El Rassi, Z. Naphthyl methacrylate-based monolithic column for RP-CEC via hydrophobic and π interactions. *Electrophoresis* <u>31</u> (2010) 991-1002.

[86] Peters, E. C.; Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography.** *Anal. Chem.* <u>69</u> (1997) 3646-3649.

[87] Danquah, M. K.; Forde, G. M. Preparation of macroporous methacrylate monolithic material with convective flow properties for bioseparation: Investigating the kinetics of pore formation and hydrodynamic performance. *Chem. Eng. J.* <u>140</u> (2008) 593-599.

[88] Tunç, Y.; Gölgelioglu, Ç.; Hasirci, N.; Ulubayram, K.; Tuncel, A. Acrylic-based high internal phase emulsion polymeric monolith for capillary electrochromatography. J. Chromatogr. A <u>1217</u> (2010) 1654-1659.

[89] Anderson, G. J.; LaPier, Z.; Cammarata, M. B.; Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M. **Peak parking determination of the obstruction factor in lauryl acrylate monolithic CEC columns.** *Electrophoresis* <u>31</u> (2010) 1583-1585.

[90] Bernabé-Zafón, V.; Beneito-Cambra, M.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M. Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 3231-3237.

[91] Lin, J.; Huang, G.; Lin, X.; Xie, Z. Methacrylate-based monolithic column with mixed-mode hydrophilic interaction/strong cation-exchange stationary phase for capillary liquid chromatography and pressure-assisted CEC. *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 4055-4065.

[92] Li, Y.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. **Poly[hydroxyethylacrylate-***co***-poly(ethylene glycol)diacrylate] monolithic column for efficient hydrophobic interaction chromatography of proteins.** *Anal. Chem.* <u>81</u> (2009) 9416-9424.

[93] Buszewski, B.; Szumski, M.; Sus, S. Methacrylate-based monolithic columns for micro-HPLC and CEC. *LC-GC Europe* <u>15</u> (2002) 792-798.

[94] Jiang, Z.; Smith, N. W.; Ferguson, P. D.; Taylor, M. R. **Preparation and characterization of long alkyl chain methacrylate-based monolithic column for capillary chromatography.** *J. Biochem. Biophys. Meth.* <u>70</u> (2007) 39-45.

[95] Okanda, F. M.; El Rassi, Z. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: IV. Preparation of neutral stearylacrylate monoliths and their evaluation in capillary electrochromatography of neutral and charged small species as well as peptides and proteins. *Electrophoresis* <u>26</u> (2005) 1988-1995.

[96] Ueki, Y.; Umemura, T.; Iwashita, Y.; Odake, T.; Haraguchi, H.; Tsunoda, K. Preparation of low flow-resistant methacrylate-based monolithic stationary phases of different hydrophobicity and the application to rapid reversed-phase liquid chromatography separation of alkylbenzenes at high flow rate and elevated temperature. *J. Chromatogr. A* <u>1106</u> (2006) 106-111.

[97] Núñez, O.; Ikegami, I.; Miyamoto, K.; Tanaka, N. Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar compounds. *J. Chromatogr. A* <u>1175</u> (2007) 7-15.

[98] Tanret, I.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. Influence of the polymerizationmixture composition for monolithic methacrylate-based columns on the electrochromatographic performance of drug molecules. *J. Pharm. Biomed. Anal.* <u>48</u> (2008) 264-277.

[99] Wang, X.; Lü, H.; Lin, X.; Xie, Z. Electrochromatographic characterization of methacrylate-based monolith with mixed mode of hydrophilic and weak electrostatic interactions by pressurized capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1190</u> (2008) 365-371.

[100] Tanret, I.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. **Pressure-assisted CEC versus CEC using methacrylate-based monolithic columns: influence of the polymerization-mixture composition.** *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 4463-4474.

[101] Wang, X.; Lin, X.; Xie, Z.; Giesy, J. P. Preparation and evaluation of a neutral methacrylate-based monolithic column for hydrophilic interaction stationary phase by pressurized capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1216</u> (2009) 4611-4617.

[102] Karenga, S.; El Rassi, Z. Neutral octadecyl monolith for reversed phase capillary electrochromatography of a wide range of solutes. *J. Sep. Sci.* <u>31</u> (2008) 2677-2685.

[103] Zhong, H.; El Rassi, Z. Neutral polar methacrylate-based monoliths for normal phase nano-LC and CEC of polar species including N-glycans. *J. Sep. Sci.* <u>32</u> (2009) 10-20.

[104] Lerma-García, M. J.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M. **Rapid determination of sterols in vegetable oils by CEC using methacrylate ester-based monolithic columns.** *Electrophoresis* <u>29</u> (2008) 4603-4611.

[105] Xu, Z.; Yang, L.; Wang, Q. Different alkyl dimethacrylate mediated stearyl methacrylate monoliths for improving separation efficiency of typical alkylbenzenes and proteins. *J. Chromatogr. A* <u>1216</u> (2009) 3098-3106.

[106] Al-Rimawi, F.; Pyell, U. Investigation of the ion-exchange properties of methacrylate-based mixed-mode monolithic stationary phases employed as stationary phases in capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1160</u> (2007) 326-335.

[107] Chen, Z.; Cai, Y.; Cheng, J.; Zhang, L. Electrochromatographic characterization of methacrylate ester-based monolith and capillary electrochromatography separation of flavonoids. *J. Chromatogr. B* <u>878</u> (2010) 2375-2378.

[108] Huang, H.; Cheng, Y.; Liu, W.; Hsu, Y.; Lee, S. **Poly(divinylbenzene-alkylmethacrylate) monolithic stationary phases in capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 5839-5847.

[109] Nischang, I.; Brüggemann, O. On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 5389-5397.

[110] Lv, Y.; Hughes, T.; Hao, X.; Hart, N. K.; Littler, S. W.; Zhang, X.; Tan, T. A novel route to prepare highly reactive and versatile chromatographic monoliths. *Macromol. Rapid Commun.* <u>31</u> (2010) 1785-1790.

[111] Nischang, I.; Brüggemann, O.; Svec, F. Advances in the preparation of porous polymer monoliths in capillaries and microfluidic chips with focus on morphological aspects. *Anal. Bioanal. Chem.* <u>397</u> (2010) 953-960.

[112] Peters, E. C.; Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry. *Anal. Chem.* <u>70</u> (1998) 2288-2295.

[113] Peters, E. C.; Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Molded rigid polymer** monoliths as separation media for capillary electrochromatography. **2.** Effect of chromatographic conditions on the separation. *Anal. Chem.* <u>70</u> (1998) 2296-2302.

[114] Yurtsever, A.; Saraçoğlu, B.; Tuncel, A. **CEC with new monolithic stationary phase based on a fluorinated monomer, trifluoroethyl methacrylate.** *Electrophoresis* <u>30</u> (2009) 589-598.

[115] Abbood, A.; Herrenknecht, C.; Proczek, G.; Descroix, S.; Rodrigo, J.; Taverna, M.; Smadja, C. Hexylacrylate-based mixed-mode monolith, a stationary phase for the nano-HPLC separation of structurally related enkephalins. *Anal. Bioanal. Chem.* <u>400</u> (2011) 459-468.

[116] Karenga, S.; El Rassi, Z. Controlling retention, selectivity and magnitude of EOF by segmented monolithic columns consisting of octadecyl and naphthyl monolithic segments – applications to RP-CEC of both neutral and charged solutes. *Electrophoresis* <u>32</u> (2011) 1033-1043.

[117] Karenga, S.; El Rassi, Z. Mixed ligand monolithic columns for reversedphase capillary electrochromatography via hydrophobic and π interactions. *Electrophoresis* <u>32</u> (2011) 1044-1053.

[118] Beiler, B.; Vincze, Á.; Svec, F.; Sáfrány, Á. **Poly(2-hydroxyethyl acrylate***co*-ethyleneglycol dimethacrylate) monoliths synthesized by radiation polymerization in a mold. *Polymer* <u>48</u> (2007) 3033-3040.

[119] Urban, J.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Hypercrosslinking: new approach to porous polymer monolithic capillary columns of large surface area for the highly efficient separation of small molecules. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 8212-8221.

[120] Urban, J.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary columns. *Anal. Chem.* <u>82</u> (2010) 1621-1623.

[121] Walsh, Z.; Levkin, P. A.; Abele, S.; Scarmagnani, S.; Heger, D.; Klán, P.; Diamond, D.; Paull, B.; Svec, F.; Macka, M. **Polymerisation and surface modification of methacrylate monoliths in polyimide channels and polyimide coated capillaries using 660 nm light emitting diodes.** *J. Chromatogr. A* <u>1218</u> (2011) 2954-2962.

[122] Geiser, L.; Eeltink, S.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Stability and repeatability of capillary columns based on porous monoliths of poly(butyl methacrylate-***co***-ethylene dimethacrylate).** *J. Chromatogr. A* <u>1140</u> (2007) 140-146.

[123] Viklund, C.; Pontén, E.; Glad, B.; Irgum, K.; Hörstedt, P.; Svec, F. **"Molded"** macroporous poly(glycidyl methacrylate-*co*-trimethylolpropane trimethacrylate) materials with fine controlled porous properties: preparation of monoliths using photoinitiated polymerization. *Chem. Mater.* <u>9</u> (1997) 463-471.

[124] Santora, B. P.; Gagné, M. R.; Moloy, K. G.; Radu, N. S. **Porogen and crosslinking effects on the surface area, pore volume distribution, and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization.** *Macromolecules* <u>34</u> (2001) 658-661.

[125] Eeltink, S.; Hilder, E. F.; Geiser, L.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Rozing, G. P.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. Th. Controlling the surface chemistry and chromatographic properties of methacrylate-ester-based monolithic capillary columns *via* photografting. *J. Sep. Sci.* <u>30</u> (2007) 407-413.

[126] Eeltink, S.; Geiser, L.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Optimization of the porous structure and polarity of polymethacrylate-based monolithic capillary columns for the LC-MS separation of enzymatic digests. *J. Sep. Sci.* <u>30</u> (2007) 2814-2820.

[127] Bisjak, C. P.; Trojer, L.; Lubbad, S. H.; Wieder, W.; Bonn, G. K. Influence of different polymerization parameters on the separation efficiency of monolithic poly(phenyl acrylate-*co*-1,4-phenylenediacrylate) capillary columns. *J. Chromatogr. A* <u>1154</u> (2007) 269-276.

[128] Wieder, W.; Lubbad, S. H.; Trojer, L.; Bisjak, C. P.; Bonn, G. K. Novel monolithic poly(*p*-methacrylate-*co*-bis(*p*-vinylbenzyl)dimethylsilane) capillary columns for biopolymer separation. *J. Chromatogr. A* <u>1191</u> (2008) 253-262.

[129] ALOthman, Z. A. **Preparation and characterization of alkyl methacrylate capillary monolithic columns.** *J. Saudi Chem. Soc.* (2011) doi: 10.1016/j.jscs.2011.01.010.

[130] Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Temperature, a simple and efficient tool for the control of pore size distribution in macroporous polymers.** *Macromolecules* <u>28</u> (1995) 7580-7582.

[131] Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Irgum, K. Monolithic, "molded", porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: control of porous properties during polymerization. *Chem. Mater.* <u>8</u> (1996) 744-750.

[132] Nischang, I.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Effect of capillary cross-section geometry and size on the separation of proteins in gradient mode using monolithic poly(butyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate) columns. *J. Chromatogr. A* <u>1216</u> (2009) 2355-2361.

[133] Lubbad, S. H.; Buchmeiser, M. R. Fast separation of low molecular weight analytes on structurally optimized polymeric capillary monoliths. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 3223-3230.

[134] Moravcová, D.; Jandera, P.; Urban, J.; Planeta, J. **Comparison of monolithic silica and polymethacrylate capillary columns for LC.** *J. Sep. Sci.* <u>27</u> (2004) 789-800.

[135] Umemura, T.; Ueki, Y.; Tsunoda, K.; Katakai, A.; Tamada, M.; Haraguchi, H. **Preparation and characterization of methacrylate-based semi-micro monoliths for high-throughput bioanalysis.** *Anal. Bioanal. Chem.* <u>386</u> (2006) 566-571.

[136] Lav, T.-X.; Carbonnier, B.; Guerrouache, M.; Grande, D. **Porous** polystyrene-based monolithic materials template by semi-interpenetrating polymer networks for capillary electrochromatography. *Polymer* <u>51</u> (2010) 5890-5894.

[137] Mohr, J. H.; Swart, R.; Huber, C. G. Morphology and efficiency of poly(styrene-*co*-divinylbenzene)-based monolithic capillary columns for the separation of small and large molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* <u>400</u> (2011) 2391-2402.

[138] Kositarat, S.; Smith, N. W.; Nacapricha, D.; Wilairat, P.; Chaisuwan, P. **Repeatability in column preparation of a reversed-phase C18 monolith and its application to separation of tocopherol homologues.** *Talanta* <u>84</u> (2011) 1374-1378.

[139] ALOthman, Z. A.; Aqel, A.; Al Abdelmoneim, H. A.; Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y.; Al-Warthan, A. A. **Preparation and evaluation of long chain alkylmethacrylate monoliths for capillary chromatography.** *Chromatographia* <u>74</u> (2011) 1-8.

[140] Huo, Y.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. Th. Efficiency of methacrylate monolithic columns in reversed-phase liquid chromatography separations. *J. Chromatogr. A* <u>1175</u> (2007) 81-88.

[141] Eeltink, S.; Rozing, G. P.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. Th. **Practical** aspects of using methacrylate-ester-based monolithic columns in capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1109</u> (2006) 74-79.

[142] Shu, X.; Chen, L.; Yang, B.; Guan, Y. **Preparation and characterization of long methacrylate monolithic column for capillary liquid chromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>1052</u> (2004) 205-209.

[143] Cantó-Mirapeix, A.; Herrero-Martínez, J. M.; Baeza-Baeza, J. J.; Simó-Alfonso, E. F. Study of peak shape and efficiency in butyl acrylate-based monolithic columns for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1216</u> (2009) 6831-6837.

[144] Enlund, A. M.; Ericson, C.; Hjertén, S.; Westerlund, D. **Capillary** electrochromatography of hydrophobic amines on continuous beds. *Electrophoresis* <u>22</u> (2001) 511-517.

[145] Palm, A.; Novotny, M. V. Macroporous polyacrylamide/poly(ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* <u>69</u> (1997) 4499-4507.

[146] Nischang, I.; Teasdale, I.; Brüggemann, O. Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the

isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography. J. Chromatogr. A <u>1217</u> (2010) 7514-7522.

[147] Li, Y.; Zhang, J.; Xiang, R.; Yang, Y.; Horváth, C. **Preparation and characterization of alkylated polymethacrylate monolithic columns for micro-HPLC of proteins.** *J. Sep. Sci.* <u>27</u> (2004) 1467-1474.

[148] Greiderer, A.; Trojer, L.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. Influence of the polymerization time on the porous and chromatographic properties of monolithic poly(1,2-bis(*p*-vinylphenyl))ethane capillary columns. *J. Chromatogr. A* <u>1216</u> (2009) 7747-7754.

[149] Nischang, I.; Teasdale, I.; Brüggemann, O. **Porous polymer monoliths for small molecule separations: advancements and limitations.** *Anal. Bioanal. Chem.* <u>400</u> (2011) 2289-2304.

[150] Wu, M.; Wu, R.; Zhang, Z.; Zou, H. **Preparation and application of organic**silica hybrid monolithic capillary columns. *Electrophoresis* <u>32</u> (2011) 105-115.

[151] Lämmerhofer, M.; Lindner, W. **Capillary electrochromatography.** J. Chromatogr. Libr. <u>67</u> (2003) 489-559.

[152] Karenga, S.; El Rassi, Z. **Trends in nonpolar polymer-based monolithic columns for reversed-phase capillary electrochromatography.** *Electrophoresis* <u>32</u> (2011) 90-104.

[153] Stulík, K.; Pacáková, V.; Suchánková, J.; Coufal, P. **Monolithic organic columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography.** *J. Chromatogr. B* <u>841</u> (2006) 79-87.

[154] Svec, F. Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. J. Sep. Sci. <u>28</u> (2005) 729-745.

[155] Courtois, J.; Szumski, M.; Georgsson, F.; Irgum, K. **Assessing the macroporous structure of monolithic columns by transmission electron microscopy.** *Anal. Chem.* <u>79</u> (2007) 335-344.

[156] Smith, N. W.; Jiang, Z. Developments in the use and fabrication of organic monolithic phases for use with high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* <u>1184</u> (2008) 416-440.

[157] Hilder, E. F.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography.** *J. Chromatogr. A* <u>1044</u> (2004) 3-22.

[158] Miller, S. Separations in a monolith. Anal. Chem. <u>76</u> (2004) 99A-101A.

[159] Chirica, G. S.; Remcho, V. T. **Novel monolithic columns with templated porosity.** *J. Chromatogr. A* <u>924</u> (2001) 223-232.

[160] Augustin, V.; Jardy, A.; Gareil, P.; Hennion M. -C. In situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: Study of polymerization conditions. *J. Chromatogr. A* <u>1119</u> (2006) 80-87.

[161] Eeltink, S.; Svec, F. **Recent advances in the control of morphology and surface chemistry of porous polymer-based monolithic stationary phases and their application in CEC.** *Electrophoresis* <u>28</u> (2007) 137-147.

[162] Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. Adsorption, Surface Area and Porosity. London: Academic Press, 1982.

[163] Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquérol, J.; Siemieniewska, I. **Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity.** *Pure Appl. Chem.* <u>57</u> (1985) 603-619.

[164] Rodrígues-Reinoso, F.; King, K. S. W.; Unger, K. K. Characterization of porous solid III. *Stud. Surf. Sci. Catal.* <u>87</u> (1994) 2-10.

[165] Oscik, J. Adsorption. New York: Wiley, 1982.

[166] Vansant, E. F.; van der Voort, P.; Vrancken, K. C. **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface.** Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995.

[167] Teixeira, V. G.; Coutinho, F. M. B.; Gomes, A. S. **Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno.** *Quím. Nova* <u>24</u> (2001) 808-818.

[168] Guan-Sajonz, H.; Guiochon, G.; Davis, E.; Gulakowski, K.; Smith, D. W. Study of the physico-chemical properties of some packing materials. III. Pore size and surface area distribution. *J. Chromatogr. A* <u>773</u> (1997) 33-51.

[169] Storck, S.; Bretinger, H.; Maier, W. F. Characterization of micro- and mesoporous solids by physisorption methods and pore-size analysis. *Appl. Catal.* <u>174</u> (1998) 137-146.

[170] Kruk, M.; Jaroniec, M.; Gilpin, R. K.; Zhou, Y. W. **Nitrogen adsorption studies of coated and chemically modified chromatographic silica gels.** *Langmuir* <u>13</u> (1997) 545-550.

[171] Bereznitski, Y.; Jaroniec, M.; Gangoda, M. E. Characterization of silicabased octyl phases of different bonding density. Part II. Studies of surface properties and chromatographic selectivity. *J. Chromatogr. A* <u>828</u> (1998) 59-73.

[172] Sonwane, C. G.; Bhatia S. K. Characterization of pore size distributions of mesoporous materials from adsorption isotherms. *J. Phys. Chem. B* <u>104</u> (2000) 9099-9110.

[173] Bereznitski, Y.; Jaroniec, M. Liquid chromatography studies of acetonitrile sorption on silica-based octyl phases. J. Liq. Chromatogr. Relat. *Technol.* <u>22</u> (1999) 1945-1964.

[174] Jaroniec, C. P.; Jaroniec, M.; Kruk, M. Comparative studies of structural and surface properties of porous inorganic oxides used in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* <u>797</u> (1998) 93-102.

[175] Gallo, J. M. R.; Bisio, C.; Gatti, G.; Marchese, L.; Pastore, H. O. **Physicochemical characterization and surface acid properties of mesoporous [AI]-SBA-15 obtained by direct synthesis.** *Langmuir* <u>26</u> (2010) 5791-5800.

[176] Grabicka, B. E.; Jaroniec, M. Adsorption properties of ordered mesoporous silicas synthesized in the presence of block copolymer Pluronic F127 under microwave irradiation. *Adsorption* <u>16</u> (2010) 385-396.

[177] Choma, J.; Górka, J.; Jaroniec, M.; Zawislak, A. **Development of** microporosity in mesoporous carbons. *Top. Catal.* <u>53</u> (2010) 283-290.

[178] Robitzer, M.; Renzo, F. D.; Quignard, F. Natural materials with high surface area. Physisorption methods for the characterization of the texture and surface of polysaccharide aerogels. *Microporous Mesoporous Mater.* <u>140</u> (2011) 9-16.

[179] Bereznitski, Y.; Jaroniec, M.; Kruk, M. Surface and structural properties of silica gels used in high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* <u>19</u> (1996) 1523-1537.

[180] Webb, P. A.; Orr, C. **Analytical Methods in Fine Particle Technology.** Norcross: Micromeritics instrument corporation, 1997.

[181] Sonwane, C. G.; Ludovice, P. J. A note on micro- and mesoporous in the walls of SBA-15 and hysteresis of adsorption isotherms. *J. Mol. Catal. A* <u>238</u> (2005) 135-137.

[182] Trojer, L.; Bisjak, C. P.; Wieder, W.; Bonn, G. K. **High capacity organic** monoliths for the simultaneous application to biopolymer chromatography

and the separation of small molecules. J. Chromatogr. A <u>1216</u> (2009) 6303-6309.

[183] Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Molded separation media: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to packed columns the fast HPLC separation of peptides, proteins, synthetic oligomers and polymers. *Macromol. Symp.* <u>110</u> (1996) 203-216.

[184] Fang, Y.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. Simple capillary flow porometer for characterization of capillary columns containing packed and monolithic beds. *J. Chromatogr. A* <u>1217</u> (2010) 6405-6412.

[185] Ueki, Y.; Umemura, T.; Iwashita, Y.; Tsunoda, K.; Haraguchi, H. **Rapid** reversed-phase separation using methacrylate-based C18 monolithic capillary columns at high flow rates and elevated temperatures. *Chem. Lett.* <u>34</u> (2005) 1198-1199.

[186] Svec, F. New developments in the field of monoliths for chromatography. *LC-GC Europe* <u>23</u> (2010) 272-278.

[187] Peters, E. C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. **Preparation of large-diameter** "molded" porous polymer monoliths and the control of the pore structure homogeneity. *Chem. Mater.* <u>9</u> (1997) 1898-1902.

[188] Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N. Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase. *J. Chromatogr. Sci.* <u>27</u> (1989) 721-728.

[189] Engelhardt, H.; Jungheim, M. Comparison and characterization of reversed phases. *Chromatographia* <u>29</u> (1990) 59-68.

[190] Nakanishi, K.; Takahashi, R.; Nagakane, I.; Kitayama, K.; Koheiya, N.; Shikata, H.; Soga, N. Formation of hierarchical pore structural in silica gel. *J. Sol-gel Sci. Technol.* <u>17</u> (2000) 191-210.

[191] Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. Formation of "molded" porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis. *Chem. Mater.* <u>7</u> (1995) 707-715.

[192] Weast, R. C. (ed.) Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland: CRC Press, 1977-1978.

[193] Gibson, G. T. T.; Mugo, S. M.; Oleschuk, R. D. **Surface-mediated effects on porous polymer monolith formation within capillaries.** *Polymer* <u>49</u> (2008) 3084-3090.

[194] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (Org.) **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Unicamp, 2006.

[195] Kele, M.; Guiochon, G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns. *J. Chromatogr. A* <u>960</u> (2002) 19-49.

[196] Xu, G.; Nambiar, R. R.; Blum, F. D. **Room-temperature decomposition of 2,2'-azobis(isobutyronitrile) in emulsion gels with and without silica.** *J. Colloid Interface Sci.* <u>302</u> (2006) 658-661.