

# UFAL

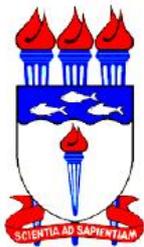
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**JAILTON ALVES DE VASCONVELOS JÚNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS PARA  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**E BIOTECNOLOGIA - PPGQB**



**JAILTON ALVES DE VASCONCELOS JÚNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS PARA**  
**CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA.**

**Máceo – AL**

**2019**

**JAILTON ALVES DE VASCONCELOS JÚNIOR**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS PARA  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, para obtenção do título de mestre em química analítica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Janaína Heberle Bortoluzzi**

**Máceo – AL**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

V331d Vasconcelos Júnior, Jailton Alves de.  
Desenvolvimento de novas fases estacionárias para cromatografia líquida /  
Jailton Alves de Vasconcelos Júnior. - 2019  
101 f. : il.

Orientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.  
Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de  
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação  
em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 90-101.

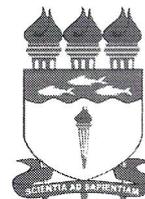
1. Fase estacionária (Cromatografia líquida). 2. Óxidos mistos. 3.  
Interações hidrofóbicas e hidrofílicas. I. Título.

CDU: 543.544.5



# PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **JAILTON ALVES DE VASCONCELOS JÚNIOR**, intitulada: “**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 28 de agosto de 2019, às 9h, na sala de reuniões do IQB.

### COMISSÃO JULGADORA:

*Janaína H. Bortoluzzi*

Profa. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi  
(PPGQB/IQB/UFAL)

*Simoni Margareti Plentz Meneghetti*

Profa. Dra. Simoni Margareti Plentz Meneghetti  
(PPGQB/IQB/UFAL)

*Ticiano Gomes do Nascimento*

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento  
(EENFAR/UFAL).

## **Agradecimentos**

A **DEUS**, pelo seu infinito amor e misericórdia, pela vida que me deu, é graças a Ele que esse trabalho foi concluído.

A minha Mãe, Maria Luna pelo seu imenso amor e cuidado, por sua paciência e apoio que com certeza foram e continuarão sendo essenciais na minha formação..

Aos meus Avós Josefa e José Sabino, que sempre foram os pilares da minha família e meus maiores exemplos, pelo amor e carinho que sempre têm me dado e por sempre me incentivarem a seguir adiante.

Ao meu irmão, Antônio, pelo companheirismo e por tornar esses anos mais leves com a sua alegria.

A minha namorada, Ledja Brittes, pelo seu amor e carinho, por me ouvir e me ajudar em tudo quanto precisei, pelo apoio e paciência nos momentos difíceis. Estar com você me faz uma pessoa melhor.

A Maysa, minha companheira de projeto, por contribuir tanto com esse trabalho, e fazer mesmo os dias de resultados ruins mais alegres.

A todo grupo de analítica do GCaR, pela amizade e momentos compartilhados, em especial Lucas, Cristian, Filipe e Débora que me acompanham desde que entrei no laboratório.

A minha Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Heberle Bortoluzzi pela oportunidade, pela orientação e por todo o conhecimento que vem compartilhando desde a graduação.

A dupla do HPLC-IR Thatiane e Dhara, por sua ajuda e amizade ao longo desses anos de mestrado.

A todos os professores e colegas do Grupo de Catálise e Reatividade Química pela ajuda, companheirismo e conhecimento compartilhado.

A todos os professores e alunos do Instituto de Química e Biotecnologia com quem tive a oportunidade de conviver nessa trajetória.

A Priscila e Lucas, meus amigos e irmãos em Cristo por tornar os dias mais leves e divertidos.

A todos meus amigos que contribuíram mesmo que indiretamente na conclusão desse trabalho, me fazendo sorrir e aliviar o estresse do dia-a-dia.

A toda IBBE, meus irmãos em Cristo, por suas orações.

A CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

O presente trabalho visa desenvolver uma FE polar composta de um óxido misto  $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-BaO-SiO}_2$ , a qual foi sintetizada pelo método da complexação metal-quitosana. Inicialmente foi feito um planejamento experimental para avaliar a influencia dos parâmetros da calcinação nas propriedades do material, com os resultados foi escolhido uma FE calcinada a  $350^\circ\text{C}$ , por apresentar uma maior área superficial ( $280 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). Com essa FE foram realizados testes cromatográficos (HPLC) para a separação de compostos oriundos da oxidação do álcool benzílico (álcool benzílico, ácido benzoico, benzaldeido e benzofenona). Essa mesma FE foi também usada em cromatografia líquida clássica (CLC) para separar mono (MAG), di (DAG) e triacilglicerideos (TAG), onde não foi alcançada a separação desses compostos. Essa FE testada apresentou certa quantidade de matéria orgânica (10,5 %) ao ser analisada por TGA, portanto foi escolhido outro material, calcinado a  $700^\circ\text{C}$ , que apresentou uma menor área superficial ( $130 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), porém não possui matéria orgânica em sua composição. Com essa FE foram realizados os mesmos testes cromatográficos em HPLC, mostrando uma maior seletividade ao ácido benzóico, com isso foi dado continuidade nos testes com compostos derivados do ácido benzóico (ácido 3- mercaptobenzoico, ácido 3- cianobenzoico e ácido 3- dimetilamino benzoico). Foi feita uma otimização univariada do método cromatográfico, onde foi possível separar os 3 compostos, porém, com certa coeluição entre dois deles (ACNB e ADAB). A adição de TFA a FM foi também testada, conseguindo uma redução na largura do pico, mas aumentando a coeluição devido a redução do tempo de retenção dos compostos. Após os testes e avaliação da eficiência cromatográfica da coluna, nota-se que há um baixo número de pratos teóricos, devido principalmente a largura dos picos, que pode ser causada pelo tamanho da partícula da FE, sendo necessária a redução do diâmetro de partícula.

**Palavras-Chave:** Fase estacionária, óxido misto, Interação Hidrofílica, Cromatografia.

## ABSTRACT

The present work aims to develop a polar SP composed of a mixed oxide  $\text{Li}_2\text{O-ZrO}_2\text{-BaO-SiO}_2$ , which was synthesized by the metal-chitosan complexation method. Initially an experimental design was made to evaluate the influence of the calcination parameters on the material properties, with the results was chosen a SP calcined at  $350^\circ\text{C}$ , because it has a larger surface area ( $280\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ). With this SP, chromatographic tests (HPLC) were performed to separate compounds from oxidation of benzyl alcohol (benzyl alcohol, benzoic acid, benzaldehyde and benzophenone). This same SP was also used in classical liquid chromatography (CLC) to separate mono (MAG), di (DAG) and triacylglycerides (TAG), where the separation of these compounds was not achieved. This SP tested presented a certain amount of organic matter (10.5%) when analyzed by TGA, so it was chosen another material, calcined at  $700^\circ\text{C}$ , which presented a smaller surface area ( $130\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ ), but not It has organic matter in its composition. With this SP, the same HPLC chromatographic tests were performed, showing greater selectivity to benzoic acid. Testing was continued with compounds derived from benzoic acid (3-mercaptobenzoic acid, 3-cyanobenzoic acid and 3-dimethylamino benzoic acid). A univariate optimization of the chromatographic method was made, where it was possible to separate the 3 compounds, but with some coelution between two of them (ACNB and ADAB). The addition of TFA to MP was also tested, achieving a reduction in peak width but increasing coelution due to reduced retention time of the compounds. After the tests and evaluation of the column chromatographic efficiency, it is noted that there is a low number of theoretical plates, mainly due to the peak width, which can be caused by the SP particle size, particle diameter reduction is required.

**Keywords:** Stationary phase, Oxide mixture, Hydrophilic interaction, Chromatography

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.....	22
Figura 2 - Estrutura química de uma fase estacionária contendo o grupamento C18.....	25
Figura 3 - Efeito da difusão dos analitos na coluna cromatográfica. ....	27
Figura 4 - Influência dos diferentes tipos de fases estacionárias na retenção de diferentes compostos. 1- fenol, 2- naftaleno sulfonato, 3- <i>p</i> - xileno sulfonato, 4- cafeína, 5- nortriptilina, 6- difenidramina, 7- benzilamina e 8- procainamida.....	28
Figura 5 - Características da cromatografia líquida por interação hidrofílica e interface entre os três principais modos de Cromatografia Líquida de alta eficiência: Cromatografia de fase normal, de fase reversa e troca iônica.....	29
Figura 6 - Mecanismo de retenção por partição entre a fase móvel e a camada de água formada na superfície da fase estacionária.....	35
Figura 7 - Diferentes interações entre as diferentes fases estacionárias com os analitos.....	36
Figura 8 - Esquema da ligação do metal à sílica através do grupo silanól.....	39
Figura 9 - Adaptação da metodologia de síntese de Silveira e colaboradores.....	42
Figura 10 - Aparato utilizado no empacotamento da coluna cromatográfica.....	46
Figura 11 - Diferentes solventes utilizados na cromatografia líquida clássica para eluição dos diferentes grupos de analitos.....	49
Figura 12 - Análise de termogravimétrica com isoterma de 450 minutos para simular calcinação e análise de DSC para avaliação das reações ocorridas durante a calcinação. .	53
Figura 13 - Termogramas das amostras Exp 1(A) , Exp 2(B), Exp 3(C), Exp 4(D), Exp 5(E), Exp 6 (F), Exp 7(G), Exp 8(H) e Exp 9(I).....	55
Figura 14 - Diagrama de Pareto obtido utilizando como resposta a perda de massa dos materiais obtidos por análise termogravimétrica.....	56
Figura 15 - Resultados das caracterizações para a fase estacionária A350, calcinada a 350 °C. (A) TGA, (B), FTIR, (C) DRX e (D) BET.....	59
Figura 16 - Resultados das caracterizações para a fase estacionária A350, calcinada a 350 °C. (A) TGA, (B), FTIR, (C) DRX e (D) BET.....	60

Figura 17 - Cromatogramas dos padrões analíticos, ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeido e benzofenona obtidos com a fase estacionária A350. ....	62
Figura 18 - Sobreposição dos cromatogramas individuais dos produtos da oxidação do álcool benzílico na fase estacionária A350. ....	63
Figura 19 - Cromatograma da mistura dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeido e benzofenona obtido com a fase estacionária A350. ....	63
Figura 20 - Sobreposição dos cromatogramas individuais dos padrões ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeido e benzofenona na coluna A700, utilizando como fase móvel um gradiente de acetonitrila e água. ....	65
Figura 21 - Cromatograma dos compostos ácido benzoico e álcool benzílico no modo NPLC com a fase estacionária A700. ....	66
Figura 22 - Cromatogramas dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico e benzaldeido no método isocrático usando a proporção 95:5 de acetonitrila:água na coluna A700. ....	67
Figura 23 - Sobreposição dos cromatogramas individuais da mistura dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico, benzofenona e benzaldeido utilizando a coluna B700 com tamanho de partícula de 10-45 micrometros. ....	69
Figura 24 - Cromatogramas individuais dos compostos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) com a fase estacionária B700. ....	70
Figura 25 - Cromatograma da mistura dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700. ....	71
Figura 26 - Cromatogramas da avaliação de temperatura da coluna para os padrões AMB, ACNB e ADAB, utilizando fluxo de 1 mL min <sup>-1</sup> e fase móvel com 95:5 de ACN:H <sub>2</sub> O Na coluna B700. ....	74
Figura 27 - Cromatogramas da avaliação de fluxo para os padrões AMB, ACNB e ADAB Na coluna B700. T = 35 °C e FM = ACN:H <sub>2</sub> O (95:05). ....	76
Figura 28 - Avaliação da proporção de solventes da fase móvel na coluna B700. T= 35 °C, Fluxo = 1 mL min <sup>-1</sup> . ....	78
Figura 29 - Análise usando gradiente de eluição da mistura dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700. ....	80

Figura 30 - Análise individual, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700.....	81
Figura 31 - Análise, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700. FONTE: Autor, 2019.....	82
Figura 32 - Análise, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B350. ....	83
Figura 33 - Análise da amostra contendo MAG, DAG e TAG em HPLC.....	85
Figura 34 - Análise das frações de CLC usando a FE A350 para separação de MAG, DAG e TAG. ....	86
Figura 35 - Análise das frações de CLC usando sílica como FE para separação de MAG, DAG e TAG. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de fases estacionárias utilizadas no modo HILIC e NPLC. ....	33
Tabela 2 - Tabela codificada do planejamento experimental.....	43
Tabela 3 - Gradiente de eluição, inicial usado na análise dos compostos oriundos da oxidação do álcool benzílico.....	47
Tabela 4 - Proporção de acetonitrila e água utilizadas no gradiente de eluição dos compostos derivados do ácido benzóico.....	48
Tabela 5 - Método cromatográfico utilizado para a separação de MAG, DAG e TAG.....	50
Tabela 6 - Resultados das áreas superficiais obtidas paa os experimentosdo planejamento experimental. T = temperatura, TA = taxa de aquecimento e tP = tempo de permanência...	52
Tabela 7 - Perdas de massa obtidas das análises termogravimétricas. ....	54
Tabela 8 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica A350. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). $t_R$ = tempo de retenção, $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria. ....	64
Tabela 9 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica A700. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). $T_R$ = tempo de retenção, $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria. ....	68
Tabela 10 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). $T_R$ = tempo de retenção, $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.....	72
Tabela 11 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700 usando gradiente nas análises dos padrões analíticos. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). $T_R$ = tempo de retenção, $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria .....	80
Tabela 12 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700 usando TFA na FM nas análises dos padrões analíticos. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). $T_R$ = tempo de retenção, $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.....	82

Tabela 13 - Porcentagens de cada classe de composto contido na amostra inicial. .... 85

## LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ACNB – Ácido 3-cianobenzoico

ADAB – Ácido 3- dimetilamino benzoico

AMB – Ácido 3- mercaptobenzoico

As – Assimetria de pico

A350 – Fase estacionária (45 – 100 µm) calcinada a 350 °C

A700 – Fase estacionária (45 – 100 µm) calcinada a 700 °C

B700 – Fase estacionária (10 – 45 µm) calcinada a 700 °C

CLC – Cromatografia líquida clássica

cm – Centímetro

COO<sup>-</sup> - Íon carboxitato

DAG – Diacilglicerideo

DRX – Difração de raios x

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform infrared spectroscopy*).

H – Altura de pico

HILIC – Cromatografia de interação hidrofílica (*hydrophilic interaction liquid chromatography*).

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

IEC – Cromatografia de troca iônica (*Ionic Exchange cromatography*)

IR – Infrared)

kV – quilovolt

mA – Miliampere

MAG – Monoacilglicerídeo

N – Número de pratos teóricos

NPLC – Cromatografia líquida de fase normal (*Normal phase liquid chromatography*)

pH – Potencial hidrogeniônico

RP – Fase reversa (*Reversed phase*)

RPLC – Cromatografia líquida de fase reversa (*Reversed phase liquid chromatography*).

Rs – Resolução dos picos

TAG – triacilglicerideo

TFA – Ácido tetrafluroacético

TGA – Análise termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis*)

T<sub>r</sub> – Tempo de Retenção

UV – Ultravioleta

W<sub>b</sub> – Largura de pico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo geral .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	21
3.2. Modos de cromatografia líquida de alta eficiência .....	23
3.3. CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL (NPLC).....	24
3.4. Cromatografia de fase reversa (RPLC).....	24
3.5. Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) .....	25
3.5.1. Tipos de fases estacionárias em cromatografia de interação hidrofílica .....	30
3.5.2. Mecanismo de retenção em HILIC .....	34
3.5.3. Fase móvel em HILIC .....	37
3.6. Métodos de modificação da sílica.....	38
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>42</b>
4.1. Síntese do óxido misto através do método da complexação metal-quitosana.....	42
4.2. Planejamento experimental .....	43
4.3. Caracterização do material .....	44
4.3.1. Difração de raios X (XRD).....	44
4.3.2. Adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> .....	44
4.3.3. Análise térmica (TGA).....	45
4.3.4. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	45
4.4. Empacotamento da coluna cromatográfica (HPLC). .....	45
4.5. Testes cromatográficos (HPLC).....	46
4.5.1. Otimização do método cromatográfico (HPLC).....	47
4.5.2. Otimização da temperatura da coluna .....	47
4.5.3. Otimização do fluxo de fase móvel.....	48
4.5.4. Otimização da composição de fase móvel.....	48
4.6. Cromatografia líquida clássica (CLC).....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1. Síntese dos óxidos mistos. ....	51
5.2. Planejamento experimental .....	51

5.2.1.	Adsorção de N <sub>2</sub> (BET) .....	51
5.2.2.	Análise termogravimétrica TGA .....	53
5.3.	Caracterizações das fases estacionárias selecionadas para os testes cromatográficos (A350 e A700).....	56
5.3.1.	Fase estacionária A350.....	57
5.3.2.	Fase estacionária A700.....	57
5.4.	Empacotamento da coluna cromatográfica.....	61
5.5.	Testes cromatográficos (HPLC).....	61
5.5.1.	Testes cromatográficos na coluna A350.....	62
5.5.2.	Testes cromatográficos na coluna A700.....	65
5.5.3.	Testes cromatográficos na coluna B700 .....	68
5.6.	Otimização do método cromatográfico .....	72
5.6.1.	Avaliação da temperatura da coluna.....	73
5.6.2.	Avaliação do fluxo de fase móvel.....	75
5.6.3.	Avaliação da proporção de fase móvel.....	77
5.6.4.	Avaliação do uso de gradiente .....	79
5.7.	Cromatografia líquida clássica (CLC).....	84
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de alta eficiência (*HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromathography*) é uma técnica analítica de separação e determinação de compostos bastante difundida e utilizada em diversas áreas: química, farmacêutica, biológica, alimentar entre outras (GORAIEB, 2013; NAZÁRIO, 2013).

A cromatografia líquida em fase normal (*NPLC, do inglês normal phase liquid chromatography.*) foi o primeiro modo de LC que surgiu paralelamente ao desenvolvimento da técnica, visto que as primeiras fases estacionárias utilizadas eram polares, sendo a sílica a principal delas, devido a sua alta área superficial e resistência mecânica. A fase móvel para esse tipo de coluna é mais apolar que a fase estacionária (RATHNASEKARA, 2017). A interação dos analitos com a fase estacionária ocorre de forma inversa do que acontece em RPLC, quanto maior a polaridade dos analitos maior será o tempo de retenção dos mesmos (McCALLEY, 2017).

A Cromatografia líquida (*LC, do inglês Liquid Chromathography*) foi, em seu desenvolvimento, dividida, principalmente, em dois modos: Cromatografia de fase normal (*NP, do inglês Normal Phase*) e Cromatografia de fase Reversa (*RP, do inglês Reversed Phase*). A RPLC é atualmente o modo mais utilizado de LC (TARAJI, 2018; ARAL, 2017). As colunas de RP contam com uma fase estacionária apolar, utilizando uma fase móvel mais polar (BUSZEWSKI, 2012). As fases estacionárias apolares são sintetizadas ligando-se um polímero apolar a um suporte cromatográfico, geralmente sílica, os polímeros mais utilizados para este fim são C8 e C18 (ZHANG, 2018). Neste modo de LC o tempo de retenção dos analitos vai aumentar conforme o aumento da polaridade da fase móvel, logo, quanto mais apolar o analito, maior será seu tempo de retenção em RPLC.

Um novo modo de LC foi introduzido na última década e tem sido bastante difundido, surgindo com uma alternativa aos modos clássicos de HPLC, tal como o modo RPLC, resolvendo alguns dos problemas associados a este modo (McCALLEY, 2017; ZHAI, 2018; TARAJI, 2018; LIANG, 2015). A cromatografia por interação hidrofílica (*HILIC, do inglês Hydrophilic interation Liquid Chromathography*), que foi denominada HILIC pela primeira vez por Alpert em 1990 (ALPERT, 1990; QIAO, 2016), tem sido chamada também de cromatografia de fase normal aquosa,

visto que faz uso dos mesmos tipos de fases estacionárias utilizadas em NPLC (ZHAI, 2018; XIONG, 2018), tais como, sílica pura, ciano, amina, amida, diol ou *zwitterion* (CAI, 2017). A diferença principal no uso dos modos NPLC e HILIC, visto que usam FE similares, está na fase móvel utilizada, onde em HILIC se usa uma fase organo-aquosa, com a porcentagem de água variando de 3 a 40% (QIAO, 2016; SENTKOWSKA, 2018)

O modo HILIC tem se tornado um dos principais modos de cromatografia e vem se desenvolvendo a cada ano, sendo usada atualmente na separação de diversos tipos de analitos polares e iônicos como, por exemplo, toxinas, aminoácidos, proteínas, extratos de plantas, carboidratos, fármacos, peptídeos, ácidos orgânicos, entre outros (RATHNASEKARA, 2017; McCALLEY, 2017; GUO, 2011; BARTÓ, 2017).

O preenchimento de lacunas presentes nos modos NPLC e RPLC tem feito com que a HILIC ganhe tanta visibilidade na última década. Uma das vantagens observadas é a maior retenção de compostos básicos e polares, possibilitando separações que não eram bem resolvidas nos outros modos cromatográficos (QIAO, 2018; HOU 2017).

A fase aquosa que compõe a FM em HILIC tem fundamental importância nas vantagens apresentadas por esse modo, pois, essa fase aquosa irá formar uma camada rica em água na superfície da FE, possibilitando uma gama de mecanismos de retenção diferentes como, partição, adsorção, troca iônica dentre outros, fazendo com que haja diferentes interações entre analito e FE, o que favorece a separação de diversas classes de compostos que não eram bem separados nos demais modos cromatográficos.

Assim os diferentes tipos de fases estacionárias em HILIC com diferentes grupos funcionais ligados, associada com a camada rica em água formada sobre a fase estacionária faz com que haja além do mecanismo de partição, entre a fase móvel e a camada rica em água sobre as partículas da fase estacionária, diversos outros mecanismos de separação além da junção de diferentes mecanismos em uma mesma análise (TARAJI, 2018; RATHNASEKARA, 2017; BUSZEWSKI, 2012).

O trabalho proposto visa sintetizar uma nova FE com uma área superficial comparável as FE comerciais utilizando como base a sílica e utilizando como modificadores da sílica uma mistura de óxidos ( $\text{Li}_2\text{O}$ ,  $\text{BaO}$  e  $\text{ZrO}_2$ ). Essa mistura de óxidos foi desenvolvida por Silveira e posteriormente utilizada por Bortoluzzi na confecção de fibras de de microextração em fase sólida (SPME). (BORTOLUZZI, 2006; SILVEIRA, 2001)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Produzir uma nova fase estacionária baseada no óxido misto  $\text{SiO}_2\text{-ZrO}_2\text{-Li}_2\text{O-BaO}$  utilizando o método de complexação metal-quitosana e aplicar em cromatografia líquida.

### 2.2. Objetivos específicos

- Otimizar a obtenção do óxido misto (Si, Zr, Li e Ba) pelo método de complexação metal-quitosana;
- Modificar a proporção de óxidos inicial (65%  $\text{Si}_2\text{O}$ , 29%  $\text{LiO}_2$ , 5%  $\text{BaO}$  e 1%  $\text{ZrO}_2$ ), para aumentar a área superficial e melhorar a eficiência de separação da FE.
- Separar o material obtido de acordo com o tamanho de partículas, utilizando peneiras granulométricas com abertura de malha de diferentes tamanhos (10-100  $\mu\text{m}$ );
- Caracterizar o material obtido com as técnicas de difração de raios X, adsorção/dessorção de  $\text{N}_2$ , infravermelho e análise termogravimétrica;
- Utilizar o material selecionado como fase estacionária (10-100  $\mu\text{m}$ ) em testes cromatográficos (HPLC) com diferentes padrões analíticos e avaliar a eficiência da separação da FE proposta;
- Utilizar o material (45-100  $\mu\text{m}$ ) em cromatografia líquida clássica (CLC) para a separação de mono, di e triacilglicerídeos (MAG, DAG E TAG) e comparar com  $\text{SiO}_2$  comercial.
- Caracterizar o material após a utilização nos testes cromatográficos com as mesmas técnicas usadas anteriormente para avaliar a estabilidade deste material.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método de separação de analitos, que utiliza métodos físico-químicos, como adsorção, troca iônica, partição ou até mesmo pelo tamanho da partícula através da separação por exclusão, para realizar essas separações. (COLLINS, 1995; SKOOG, 2009).

A cromatografia consiste principalmente de duas fases, uma fase móvel e uma fase estacionária, onde uma mistura de analitos presentes na amostra será transportada através da fase estacionária pela fase móvel e através da diferença de interação da fase móvel e da fase estacionária com os analitos, ocorrerá a separação dos componentes da mistura. Os compostos vão ser eluídos da coluna com tempos de retenção distintos devido a essas diferentes interações que cada um vai ter tanto com a fase móvel quanto com a fase estacionária. (COLLINS, 1995; SKOOG, 2009).

A introdução da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na década de 70 como uma ferramenta de separação trouxe muitos avanços na área da química analítica (GAMA 2012). HPLC é uma técnica analítica que pode ser usada para analisar uma grande diversidade de compostos de forma quantitativa com uma alta resolução num curto tempo de análise. (GORAIEB, 2013). HPLC é uma técnica amplamente aceita e é muito utilizada em vários campos da ciência, tendo um uso bastante amplo na indústria, principalmente na parte de controle de qualidade dos seus produtos (GAMA 2018, CLAESSENS 2004).

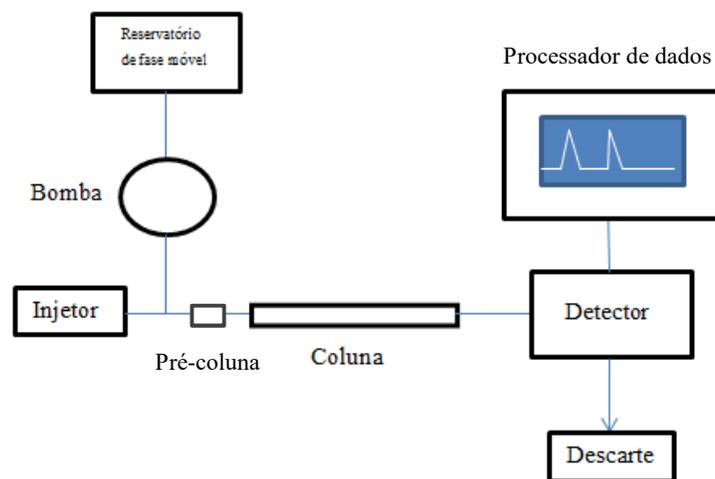
As várias técnicas de cromatografia líquida existentes oferecem mecanismos únicos para a separação e determinação quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos, mesmo aqueles com formas moleculares parecidas, de forma rápida e eficiente, por isso se torna uma técnica indispensável nas áreas da medicina, farmacêutica, química, alimentos, tecnologia, combustíveis, no controle da poluição ambiental entre outras. (PESEK, 2002).

Uma das principais vantagens em HPLC é a possibilidade de mudanças dos parâmetros do método cromatográfico, principalmente no gradiente da fase móvel,

aumentando ou diminuindo a sua força e com isto, possibilitando uma maior seletividade na separação dos analitos. (BORÓWOKO, 2005)

O equipamento de HPLC (Figura 1) é composto principalmente por um reservatório de fase móvel, um sistema de injeção, um sistema de bombeamento, para empurrar a fase móvel através da coluna a altas pressões, uma pré-coluna composta da mesma FE da coluna, com o intuito de aumentar a vida útil da mesma, mas com um comprimento menor que a coluna principal, uma coluna de aço inoxidável recheada com a fase estacionária (FE), um detector e um processador de dados.

**Figura 1- Esquema do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.**



FONTE: Autor, 2019.

Os detectores em HPLC são na sua maioria não destrutíveis e podem ser usados em série. Muitos detectores foram desenvolvidos na última década para essa técnica cromatográfica, detectores espectrofotométricos com comprimentos de ondas variáveis, detectores de fluorescência e eletroquímicos. O espectrômetro de massas também é usado como detector, através do acoplamento dos dois equipamentos (COLLINS, 1995).

A medida que a técnica foi evoluindo, a eficiência e a resolução dos picos obtidos nas análises foram sendo melhorados, assim como o tempo de análise. Isso ocorreu graças a novos aparatos adaptados ao equipamento que permitiram o uso de gradientes de solventes, por exemplo, mas muito dessa evolução ocorreu devido a pesquisas no desenvolvimento de novas fases estacionárias, com o surgimento de

novos materiais e com a diminuição do tamanho das partículas. (PACHECO, 2014; COLLINS, 1995).

A eficiência da técnica de HPLC depende muito da síntese de materiais adequados a essas separações cromatográficas (LIANG 2009). Os primeiros experimentos utilizando HPLC tinham a sílica como fase estacionária, por ser um composto que apresenta características adequadas para uma FE, como, boa resistência térmica e mecânica, importante para suportar a mudança de temperatura e as altas pressões utilizadas, além da alta área superficial, assim como a facilidade de modificação de sua superfície, facilitando a síntese de novas FE. (PACHECO, 2014; LIANG 2009; KIRKLAND, 2006).

Entretanto a sílica apresenta algumas desvantagens, como a instabilidade em valores de pH extremos (GOMES 2018), sendo importante o uso de outros óxidos metálicos, como,  $TiO_2$ ,  $ZnO$  e  $Al_2O_3$  como FE ou suporte cromatográfico, ou a modificação da sílica com esses óxidos a fim de melhorar suas características. (GORDILLO-DELGADO 2017; LIANG 2009).

### **3.2. Modos de cromatografia líquida de alta eficiência**

Com o desenvolvimento da técnica de HPLC e o avanço tecnológico, foram desenvolvidas novas FE a fim de se obter melhores separações para diferentes tipos de compostos, surgindo também diferentes modos cromatográficos em HPLC, distintos entre si por seus mecanismos de retenção.

Dentre esses modos cromatográficos destacam-se a cromatografia de fase normal (NPLC, do inglês *normal phase liquid chromatography*), de fase reversa (RPLC, do inglês *reversed phase liquid chromatography*), de troca iônica (IEC, do inglês *ion-exchange change chromatography*), Exclusão de tamanho e mais recentemente, a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography*).

### **3.3. CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL (NPLC)**

Em NPLC a fase estacionária utilizada é mais polar que a fase móvel, dessa forma a interação com os analitos se dará em função da polaridade dos mesmos. Portanto, quanto maior a polaridade dos analitos, maior será sua interação com a FE, e maior será sua retenção na coluna cromatográfica. Dessa forma, o aumento da força da FM ocorre quando se aumenta a sua polaridade (BUSZEWSKI, 2012).

No início da utilização da técnica de HPLC o modo de cromatografia de fase normal era predominante, visto que a maioria das FE utilizadas eram polares, assim como a sílica. O mecanismo de retenção em NPLC, pode ser melhor explicado como sendo uma competição entre os analitos e a FM pelos sítios de adsorção da FE. Para o caso da sílica esses sítios seriam os grupos silanóis (JANDERA, 2011; BUSZEWSKI, 2012).

A NPLC clássica utilizava com FE em suas colunas os óxidos puros, como a sílica ou alumina, por exemplo, surgindo posteriormente as FE quimicamente ligadas, as quais utilizam a sílica, principalmente, como suporte (WU, 2016). A esse suporte são ligados as moléculas que interagiram com os analitos, que podem conter diferentes grupos funcionais, como, diol, ciano e amino (WU, 2016; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2001).

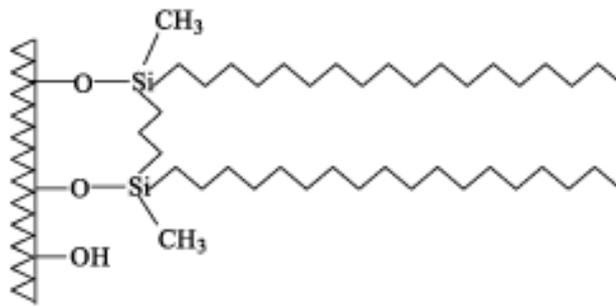
Atualmente a NPLC não é tão frequentemente utilizada, perdendo espaço para outros modos cromatográficos, como RPLC ou HILIC, mas ainda é bastante utilizada em algumas aplicações, como, por exemplo, na análise de lipídeos (PRACHE, 2016), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (WU, 2016; SUTTON, 2007; JIANG, 2016) e amostras de petróleo (ORO, 2012; ORO, 2011).

### **3.4. Cromatografia de fase reversa (RPLC)**

Com a busca cada vez maior de FE mais eficientes para análise de compostos básicos ou muito polares, surgiram às colunas de fase reversa (RP). Esse tipo de fase estacionária é o muito popular em HPLC atualmente por ser mais resistente e ter uma maior aplicabilidade, podendo ser usada na análise de grande parte dos fármacos, que são compostos básicos em sua maioria e tem problemas de interação em NPLC. (BORGES, 2012; KIRKLAND, 1993).

A RPLC é atualmente o modo mais utilizado de LC. As colunas de RP contam com uma fase estacionária apolar, utilizando uma fase móvel polar (BARTÓ, 2017; McCALLEY, 2017; RATHNASEKARA, 2017). As fases estacionárias apolares são sintetizadas ligando-se um composto apolar a um suporte, geralmente sílica, e os compostos mais utilizados para este fim são C8 e C18 (Figura 2) que são hidrocarbonetos apolares. Neste modo de LC o tempo de retenção dos compostos vai aumentar com o aumento da polaridade da fase móvel. Assim, quanto mais apolar o analito, maior será seu tempo de retenção em RPLC (BAGHERI, 2017).

**Figura 2 - Estrutura química de uma fase estacionária contendo o grupamento C18.**



Fonte: Silva, 2004

A RPLC muitas vezes apresenta problemas na separação de compostos muito básicos, apresentando um alargamento dos picos devido à interação dos analitos com os grupos ácidos residuais do suporte cromatográfico. Para contornar esse problema métodos para proteger a sílica e desativar os grupos silanóis residuais vêm sendo utilizados para aumentar a resistência, durabilidade e aplicabilidade da fase estacionária. Entretanto, muitas vezes é necessário escolher outro modo cromatográfico para a análise desses compostos (GORAIEB, 2013; SILVA, 2005).

### **3.5. Cromatografia de interação hidrofílica (HILIC)**

Um novo modo de LC ganhou força na última década e vem sendo bastante difundido e utilizado, surgindo com uma alternativa a RPLC, preenchendo as lacunas deste tipo de cromatografia (BUSZEWSKI, 2012, TARAJI, 2018; LIANG, 2015; McCALLEY, 2017; ZHAI, 2018). A cromatografia por interação hidrofílica (*HILIC*, do

*inglês Hydrophilic interaction Liquid Chromatography*) pode ser considerada como uma variante da NPLC, pois, faz uso de fases estacionárias polares (ZHAI, 2018; SENTKOWSKA, 2018), tais como, sílica pura, ou grupamento ciano, amina, amida, diol ou *zwitterion* (CAI, 2017). A denominação HILIC foi dada por Alpert em 1990 (GUO, 2011; ALPERT, 1990; QIAO, 2016).

A principal diferença entre os modos de NP e HI está na fase móvel utilizada, o que influencia diretamente no mecanismo de retenção da coluna. Em HILIC apesar de a fase estacionária ser polar, a fase móvel utilizada também é polar, sendo composta por um solvente orgânico menos polar, geralmente acetonitrila (ACN), com certa quantidade de água que é a fase móvel normalmente mais utilizada para análises em uma coluna de RPLC (ZHAI, 2018; SENTKOWSKA, 2018; QIAO, 2016).

As colunas de RP apresentam como principal desvantagem a dificuldade em separar compostos muito polares e fármacos básicos, apresentando pequenos tempos de retenção e conseqüentemente uma baixa eficiência (BAGHERI, 2017; QIAO, 2018). Uma coluna de NP poderia resolver essa desvantagem da RP, separando esses tipos de compostos, entretanto a utilização de uma fase móvel mais apolar neste modo dificulta a miscibilidade de alguns analitos mais polares na fase móvel. Nesse contexto aparece a HILIC que faz uso de uma fase estacionária polar, o que aumenta a retenção de analitos polares, usando uma fase móvel também polar, na qual os analitos polares serão miscíveis (QIAO, 2016; GUO, 2011; BUSZEWSKI, 2012).

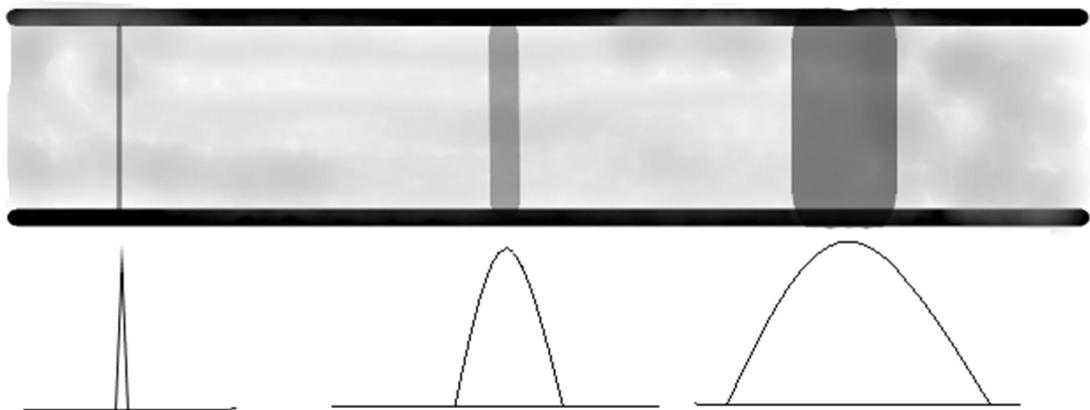
A HILIC tem crescido a cada ano, sendo usada atualmente na separação de diversos analitos polares como, por exemplo, toxinas, aminoácidos, proteínas, extratos de plantas, carboidratos, fármacos, peptídeos, ácidos orgânicos, entre outros. Podendo tanto fazer a separação de compostos neutros como de compostos carregados (McCALLEY, 2017; RATHNASEKARA, 2017; BARTÓ, 2017).

As vantagens do uso da HILIC frente à NPLC e RPLC fizeram com que este modo de LC ganhasse tanta força na última década. Dentre as vantagens observadas estão a maior retenção de compostos básicos e polares (QIAO, 2018; HOU, 2017), diminuição da pressão do sistema por usar solventes menos densos (McCALLEY, 2017; TARAJI, 2018), podendo também ser utilizada em um maior número de detectores como, por exemplo, espectrometria de massas (*MS, do inglês*

*Mass spectrometry*) por usar uma fase móvel com pouca concentração de água, diferentemente de RPLC (GOU, 2011; GÁRCIA-GOMÉZ, 2013).

A fase móvel em HILIC, normalmente, possui grandes quantidades de solvente orgânico (60 - 97%), tipicamente acetonitrila, e concentrações menores da fase aquosa (40 - 3%), o que resulta em uma FM menos viscosa, resultando em menores pressões nas análises em HPLC e conseqüentemente menos ruído (MCCALLEY, 2008). Entretanto, a baixa viscosidade da fase móvel aumenta a difusão da amostra na coluna (Figura 3), o que resulta em picos mais largos (SONG, 2016). Quando utilizada uma FM típica de HILIC (95% ACN) é reportado a ocorrência de um acréscimo no coeficiente de difusão de 2 ou mais em comparação com água pura (KAISER, 2009; THOMPSON, 2006). Os picos mais largos ocasionados pela difusão podem, por exemplo, causar a coeluição dos analitos presentes na amostra analisada, se estes apresentarem tempos de retenção próximos.

**Figura 3 - Efeito da difusão dos analitos na coluna cromatográfica.**

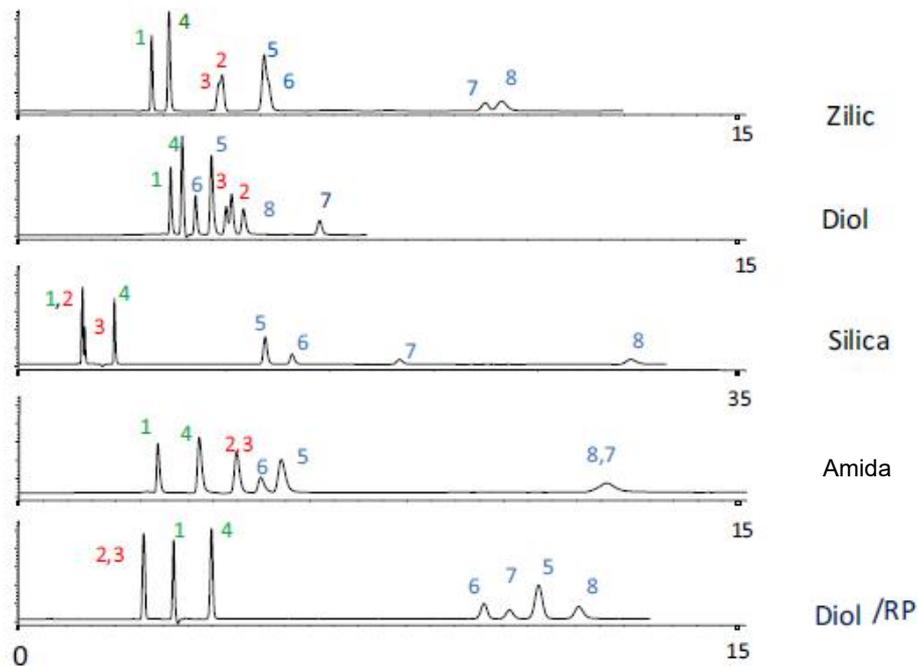


FONTE: Autor, 2019.

O mecanismo em HILIC é comumente descrito como a partição dos analitos entre a camada de água adsorvida na FE e a fase orgânica da FM (ALPERT, 1990). Entretanto, os diferentes tempos de retenção para os compostos polares, ou seja, a seletividade para diferentes compostos polares indica que as interações adsorptivas ou iônicas, por exemplo, dos analitos com a FE, contribuem, no mecanismo de retenção desse modo cromatográfico, levando a diferentes seletividades de

compostos ácidos, básicos ou neutros (Figura 4) (MCCALLEY, 2017; JANDERA, 2017; ALPERT, 1990; JANDERA, 2011).

**Figura 4 - Influencia dos diferentes tipos de fases estacionárias na retenção de diferentes compósitos. 1- fenol, 2- naftaleno sulfonato, 3- *p*- xileno sulfonato, 4- cafeína, 5- nortriptilina, 6- difenidramina, 7- benzilamina e 8- procainamida.**



FONTE: Adaptado de McCALLEY, 2017.

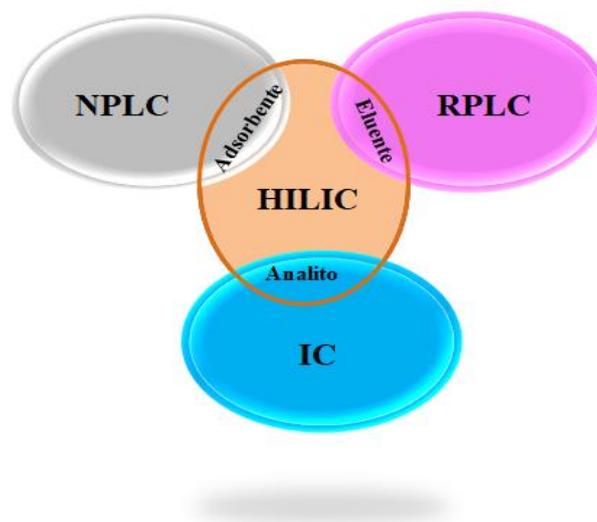
Assim os diferentes tipos de fases estacionárias em HILIC com diferentes grupos funcionais ligados, associada com a camada rica em água formada sobre a fase estacionária faz com haja além do mecanismo de partição, entre a fase móvel e a camada rica em água sobre as partículas da fase estacionária, diversos outros mecanismos de separação (BUSZEWSKI, 2012, RATHNASEKARA, 2017; TARAJI, 2018).

A adsorção da camada rica em água à FE pode, também, ser afetada pelas propriedades específicas da FE utilizada. Interações iônicas, grupos funcionais polares, ligações de hidrogênio, grupos silanois ionizados na sílica, ou grupos silanol residual na sílica modificada além de contribuir para retenção dos analitos, pode controlar a adsorção da camada de água à superfície da FE (JANDERA, 2017; MCCALLEY, 2017).

Diferentes FE com diferentes polaridades são utilizadas em HILIC, promovendo diferentes interações entre analito e FE, o que permite a separação de diversos compostos orgânicos diferentes, como: peptídeos, proteínas, fármacos, metabólitos, entre outros. FE que possuem vários grupos polares como a sílica (através dos diferentes grupos silanóis) e outros óxidos inorgânicos podem apresentar um mecanismo de retenção misto, apresentando, além do mecanismo normal de HILIC, interações iônicas (BUSZEWSKI, 2012; JANDERA, 2011).

De forma resumida, pode-se dizer que a HILIC se apresenta como uma alternativa a RPLC que é o modo mais utilizado atualmente. HILIC utiliza fases estacionárias tradicionais, usadas em NPLC, como sílica, e uma fase móvel mais próxima à usada em RPLC, com uma mistura de solvente orgânico e água ou um tampão (3-40%) (TARAJI, 2018; BUSZEWSKI, 2012), sendo eficiente na separação tanto de espécies polares como espécies iônicas (GOU, 2011). Portanto é possível inferir que a HILIC complementa os modos de cromatografia em NP e RP como também pode ser usada como cromatografia de troca iônica, como é mostrado na Figura 5.

**Figura 5 - Características da cromatografia líquida por interação hidrofílica e interface entre os três principais modos de Cromatografia Líquida de alta eficiência: Cromatografia de fase normal, de fase reversa e troca iônica.**



FONTE: Buszewski, 2012.

HILIC tem tido bastante destaque por resolver problemas de separação de compostos muito polares, pois estes não apresentam tempo de retenção suficiente em RPLC que possibilite a separação desses analitos (LIANG, 2015) e nem possuem carga suficiente para serem retidos efetivamente por interações eletrostáticas em IC (QIAO, 2018; BAGHERI, 2017).

Recentemente, outra estratégia de LC tem tido destaque, a qual incorpora mais de um modo de LC. Normalmente o que tem sido mais pesquisado envolve HILIC/RPLC, esse modo tem apresentado múltiplos mecanismos de separação, o que contribui para uma maior seletividade na separação dos analitos (LIANG, 2015; GARGANO, 2013; XIONG, 2018).

### **3.5.1. Tipos de fases estacionárias em cromatografia de interação hidrofílica**

Têm sido reportados na literatura diversos tipos de fases estacionárias para uso como HILIC (Tabela 1) (ZHANG, 2018). Qualquer fase estacionária polar pode ser empregada em HILIC, desde que esta possa adsorver a água da fase móvel utilizada para formar uma camada aquosa na superfície do adsorbente (TARAJI, 2018). Assim, as fases estacionárias em HILIC podem ser desde a sílica não derivatizada até polímeros orgânicos polares. Além disso, a sílica pode ainda ser modificada com a adição de vários grupos funcionais polares diferentes, gerando diversas outras fases estacionárias que podem atuar como coluna de interação hidrofílica (TARAJI, 2018; RATHNASEKARA, 2017; LIANG, 2015; BARTÓ, 2017).

Com o crescimento da demanda em análises de compostos polares devido ao surgimento deste modo de cromatografia, o desenvolvimento de novas colunas para serem usadas em HILIC vem crescendo, e com isso também cresce o número de fases estacionárias disponíveis, podendo ser encontradas diversos materiais usando suportes diferentes, sendo o principal deles a sílica, funcionalizados com grupos funcionais polares, como amina, amida, diol, ciano, urea, amino ácidos, polietileno glicol, peptídeos, poli-(succinamida) ou *Zwitterions* (Figura 2) (TARAJI, 2018; RATHNASEKARA, 2017; LIANG, 2015; BARTÓ, 2017).

Com essa gama de fases estacionárias que podem ser utilizadas no modo HILIC, muitas são as aplicações já reportadas na literatura, tendo cada fase

estacionária sua particularidade em termos do mecanismo de retenção, possibilitando diferentes aplicações para cada tipo de material. Para exemplificar, fases estacionárias modificadas com o grupamento diol têm sido utilizadas na separação de proteínas e drogas farmacêuticas (TARAJI, 2018)

As colunas de sílica não modificada são ainda as mais utilizadas em HILIC, principalmente no setor farmacêutico e clínico (JANDERA, 2018). As colunas de sílica no modo NPLC apresentam algumas desvantagens na análise de compostos polares, como a retenção do analito de forma irreversível, entretanto a presença significativa de água na fase móvel faz com que esse problema seja minimizado ou não ocorra (GUO, 2011).

As colunas de sílica não modificada no modo HILIC podem ser utilizadas tanto para análise de compostos muito polares e compostos básicos como fármacos, até compostos com carga, pois devido aos grupos silanóis da cadeia polimérica da sílica, esta pode obter esses grupos carregados, dependendo do pH da fase móvel utilizada. Uma vantagem apresentada pelas colunas de sílica não modificada em comparação com as fases estacionárias quimicamente ligadas é que não irá ocorrer o fenômeno de sangramento. Nas colunas quimicamente ligadas, isso irá ocorrer com o tempo de utilização e também em função da fase móvel empregada. Com o sangramento da coluna os grupamentos ligados à sílica vão sendo dissolvidos no eluente, modificando a estrutura do material, tornando as análises irreprodutíveis com o passar do tempo (HOU, 2017).

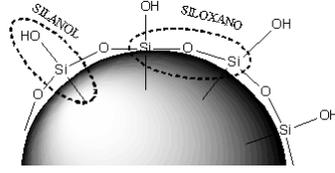
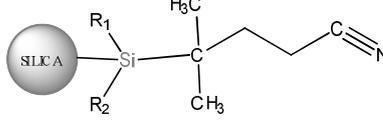
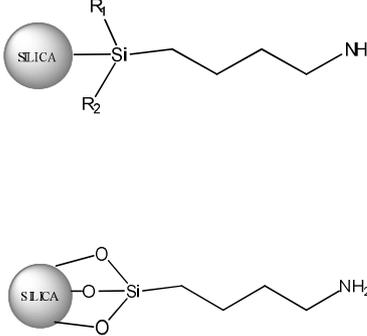
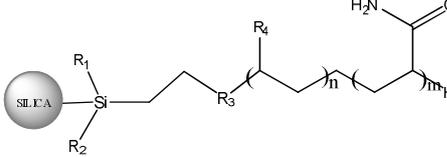
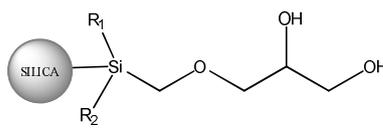
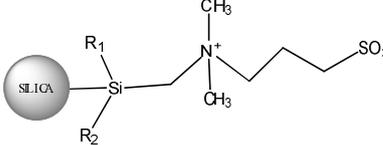
A sílica como FE em HILIC pode ser usada na separação de diversos tipos de compostos orgânicos, tendo sua eficiência aumentada conforme há a diminuição do tamanho de partícula da mesma (JANDERA, 2017). A sílica, devido as hidroxilas da sua superfície, pode ser facilmente modificada com diversos grupos funcionais polares para ser usada como FE em HILIC. Grupamentos polares como, amida, diol, amina, trocadores iônicos, zwitterionic, ciclodextrina, entre outros, são reportados na literatura (JANDERA, 2017; BUSZEWSKI, 2012).

Visto que a sílica possui instabilidades frente a valores de pH extremos, modificações podem ser feitas na sua superfície com outros óxidos, a fim de se obter uma maior estabilidade em comparação a sílica pura (NAWROCKI, 2004; JANECKOVA, 2010). O óxido de Zircônio ( $ZrO_2$ ) é bastante utilizado para fazer esta

modificação na sílica, conferindo diferentes propriedades, como por exemplo, uma maior afinidade por bases de Lewis, devido a acidez de Lewis do  $ZrO_2$  (JANDERA, 2017).

Dentre as colunas de fase ligada, a coluna de amina, mais especificamente aminopropil, foi à primeira coluna dessa natureza utilizada em separações de HILIC e ainda é bastante empregada, principalmente nas análises de aminoácidos, carboidratos, peptídeos ácidos carboxílicos, além de outros metabolitos e fármacos. As colunas modificadas com amina, assim como as de sílica não modificada, podem ser utilizadas, também, na análise de compostos carregados, uma vez que quando utilizadas fases móveis com baixos valores de pH, o grupamento amina (amina primária) irá ficar positivamente carregado, o que irá permitir as interações eletrostáticas com os analitos carregados (GUO, 2011; TARAJI, 2018).

Tabela 1 - Diferentes tipos de fases estacionárias utilizadas no modo HILIC e NPLC.

Fase estacionária	Estrutura
<b>Sílica não modificada</b>	
<b>Ciano</b>	
<b>Amina</b>	
<b>Amida</b>	
<b>Diol</b>	
<b>Zwitterion</b>	

FONTE: Adaptado de Buszewski, 2012

As colunas modificadas com grupamento amida, diferente das anteriores, não possuem a capacidade de interagir com os analitos como um trocador de íons, pois devido a sua baixa basicidade, a mesma não se torna carregada com a variação do pH do eluente (GARCÍA-GÓMEZ, 2013; GUO, 2011).

As fases estacionárias modificadas com grupamentos ciano e diol são mais utilizadas para NPLC do que para HILIC. O grupamento ciano, devido à falta de capacidade de formar ligações de hidrogênio, se torna menos hidrofílico o que prejudica a retenção de compostos mais polares, levando a uma menor seletividade na separação de compostos muito polares, tendo aplicações bastante limitadas em HILIC. Por outro lado as colunas com grupamento diol são mais comumente encontradas em análises usando HILIC por ter a capacidade de formar ligações de hidrogênio além de possuírem caráter mais hidrofílico (TARAJI, 2018; GARCÍA-GÓMEZ, 2013)

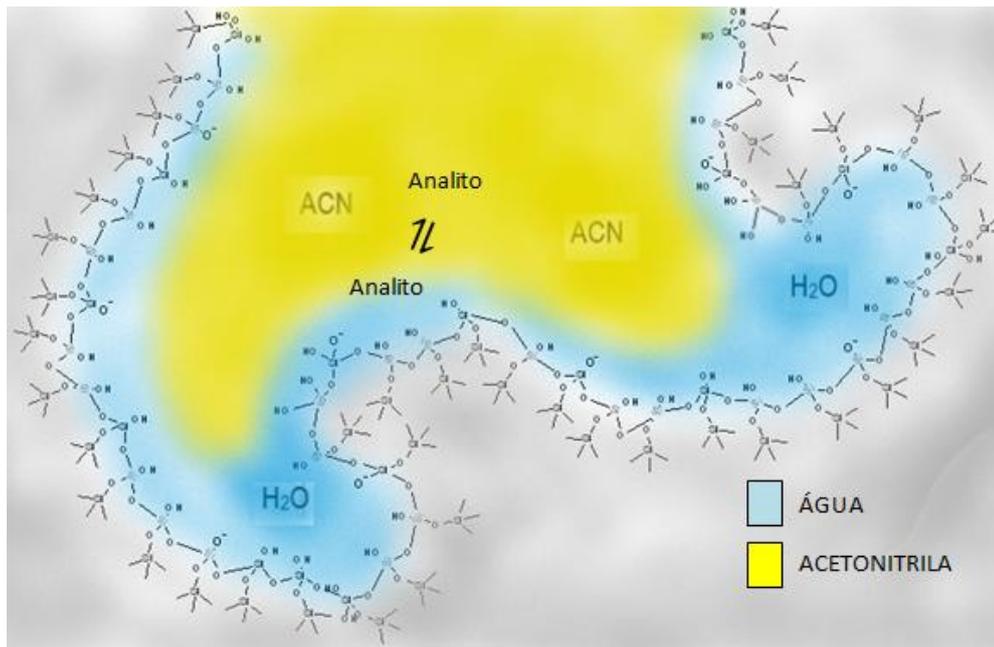
Os *Zwitterions* são espécies anfóteras que possuem ao mesmo tempo em sua estrutura, tanto carga positiva quanto carga negativa, sendo, portanto uma espécie com carga superficial neutra. Esse tipo de composto é relativamente novo como adsorbente em HPLC. Os *Zwitterions* apresentam uma atração eletrostática menor do que outras fases estacionárias carregadas, entretanto a presença de cargas positivas e negativas na molécula permite que tanto substâncias catiônicas como aniônicas sejam retidas na coluna (TARAJI, 2018; GARCÍA-GÓMEZ, 2013; GUO, 2011).

### 3.5.2. Mecanismo de retenção em HILIC

Os mecanismos de retenção dos analitos no modo HILIC ainda constituem objeto de estudo e discussões, a fim de elucidar as possíveis interações. Como já citado anteriormente, Alpert, que utilizou pela primeira vez o termo HILIC, sugeriu que o mecanismo de retenção presente nas colunas de HILIC ocorra por partição, em que os analitos serão particionados entre o solvente que está eluindo através da coluna e a camada de fase móvel rica em água, parcialmente imobilizada na fase estacionária (Figura 6) (ALPERT, 1990; BARTÓ, 2017; JANDERA, 2018).

Entretanto, outros pesquisadores têm adotado teorias diferentes a fim de explicar o mecanismo de retenção dos analitos nessas colunas, que envolvem a partição entre a fase móvel e a fase estacionária e a adsorção do analito na superfície da fase estacionária (BUSZEWSKI, 2012).

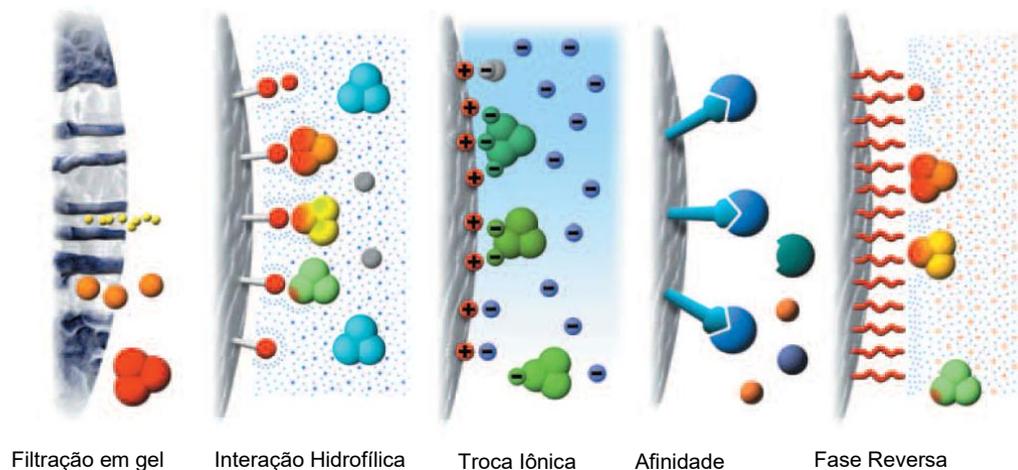
**Figura 6 - Mecanismo de retenção por partição entre a fase móvel e a camada de água formada na superfície da fase estacionária.**



FONTE: Autor, 2012.

O mecanismo envolvido na retenção de diferentes analitos em HPLC vai depender das interações que irão existir entre analito e fase móvel, analito e fase estacionária e fase estacionária com fase móvel (BUSZEWSKI, 2012; ARAL, 2017) (Figura 7). O mecanismo de separação em RPLC pode ser descrito satisfatoriamente como sendo por partição, já a retenção em NPLC é baseada na adsorção de superfície (HEMSTROM, 2006). Entretanto em HILIC tem sido observado um mecanismo de retenção misto, o qual apresenta como principal mecanismo a partição do analito entre a fase orgânica da fase móvel e a fase enriquecida com água parcialmente adsorvida na coluna cromatográfica. Outras interações importantes como interações eletrostáticas (LOGETHETI, 2018) e ligações de hidrogênio contribuem na separação das espécies químicas analisadas (GRECO, 2013).

**Figura 7 - Diferentes interações entre as diferentes fases estacionárias com os analitos.**



FONTE: Adaptado de Agilent Technologies, 2016.

Fases estacionárias com grupos de cargas opostas apresentam de forma mais significativa a influência das forças eletrostáticas na retenção dos analitos. Desse modo os analitos podem ser retidos ou repelidos pelos grupos carregados através das interações eletrostáticas (Figura 7). O fator estérico também contribui com a força da carga, dessa forma as colunas podem ter uma liquidez de carga negativa ou positiva maior. Portanto em uma fase estacionária com liquidez de cargas negativas maior, analitos negativamente carregados serão repelidos, diminuindo seu tempo de retenção (LOGETHETI, 2018; GRECO, 2013; ALPERT, 2008).

O mecanismo de partição entre fase móvel rica em solvente orgânico e a camada de fase móvel rica em água imobilizada na fase estacionária é o mais empregado no estudo do mecanismo de retenção dos analitos. Basicamente esse mecanismo se dá pela diferença de distribuição dos analitos entre a acetonitrila e a água imobilizada na fase estacionária hidrofílica (TARAJI, 2018; BUSZEWSKI, 2012; QIAO, 2016). Deste modo, quanto mais hidrofílico for o composto em análise maior será seu tempo de retenção, visto que o mesmo vai ter uma maior interação com a camada de água imobilizada (ZHANG, 2018). Por esse mecanismo pode-se dizer que a ordem de retenção dos analitos em HILIC se assemelha ao que iria ocorrer em uma análise em NPLC (SILVA, 2016).

### 3.5.3. Fase móvel em HILIC

Além da FE, o mecanismo de retenção pode ser alterado dependendo das proporções de fase orgânica e aquosa utilizadas na FM. Em Fases móveis com alta concentração de acetonitrila, a retenção dos compostos é regida principalmente pelas interações polares. Por outro lado, quando se tem uma alta concentração de fase aquosa na FM, o mecanismo de retenção se assemelha a RPLC, tendo as interações hidrofóbicas como causadora principal da retenção das espécies químicas.

Vários autores testaram outros solventes orgânicos em HILIC, mas a acetonitrila ainda é a mais utilizada neste modo cromatográfico. Suas características contribuem para isso, como sua boa transparência UV, possibilitando o uso com esse tipo de detector. Além disso, as baixas concentrações de fase aquosa, quando se usa ACN, causa um aumento da retenção dos compostos, devido à diminuição da partição dos analitos entre a fase aquosa e orgânica, ou devido ao aumento das interações adsorptivas da FE (KUMAR, 2013).

Os principais solventes orgânicos testados em HILIC para substituir a ACN têm sido álcoois, como, isopropanol, etanol e metanol (MELNIKOV, 2016). Lindner e colaboradores, ao testar a separação de uracil/uridina utilizando como FM metanol / tampão acetato de amônio 20 mM (95:5% v:v) obtiveram baixa retenção e separação dos compostos ineficiente, mas, ao substituir metanol por acetonitrila, nas mesmas proporções, foi obtida uma boa separação dos compostos e um maior tempo de retenção (McCALLEY, 2017).

O uso de tampão é bastante comum em HILIC, principalmente para estabilizar as cargas dos grupos funcionais da FE, assim como dos analitos. Os tampões mais utilizados para este fim são os tampões dos sais, formiato de amônio e acetato de amônio, uma vez que esses sais são solúveis em altas concentrações de ACN e cobrem a maior parte da faixa de pH usada em colunas de HILIC. Ácidos simples como os ácidos acético e fórmico, tem sido usados, mas não possuem a mesma força iônica em altas concentrações de ACN (HEATON, 2014; MCCALLEY, 2017).

Tampões com valores de pH mais baixos têm sido testados recentemente, mostrando alterações no mecanismo de retenção da coluna. Enquanto a FM organo-

aquosa usando sais de amônio para fazer o tampão, utilizada em uma coluna de sílica, resultava em um mecanismo semelhante a trocadores de cátion, tampões com pH mais baixo, utilizando ácido tetrafluoracético (TFA), dá a coluna um comportamento de trocador de ânions. Dessa forma há um acréscimo na retenção de compostos ácidos (MCCALLEY, 2015).

Outros fatores afetam, ainda, a retenção dos compostos em HILIC, como é o caso da temperatura, como mostrado por Hao e colaboradores. Onde o aumento da temperatura da coluna diminui o tempo de retenção dos compostos, devido a diminuição da viscosidade da FM. Entretanto, quando utilizada uma coluna de sílica pura, principalmente na análise de compostos básicos, é notado um acréscimo no tempo de retenção para as espécies químicas analisadas quando se aumenta a temperatura. Uma das possíveis explicações para esse fenômeno pode ser o aumento das interações iônicas entre analito e FE (HAO, 2008; KUMAR, 2013). Entretanto não se tem uma explicação totalmente aceita para esse comportamento. McCalley destaca que “Nenhuma explanação convincente para o aumento da retenção de bases com temperatura tem sido proposta” (McCALLEY, 2017).

### **3.6. Métodos de modificação da sílica**

Atualmente diferentes métodos são usados para a síntese de fases estacionárias, principalmente para a síntese de suportes cromatográficos mais estáveis. Estes diferentes métodos de síntese buscam a obtenção de um material com maior estabilidade e uma melhor interação com grupos polares, para tentar resolver problemas nas análises de compostos polares mais complexos. (WANG, 2013; NAZÁRIO, 2013).

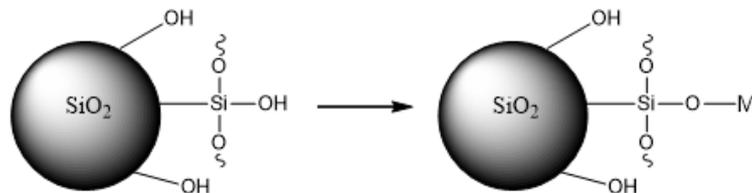
Um dos principais problemas na separação de compostos polares é a interação dos analitos com os grupos silanóis residuais, que podem interagir fortemente, ocasionando o alargamento do pico ou até mesmo se ligarem irreversivelmente. Para resolver esse problema, tem-se revestido a sílica com outros óxidos metálicos, como por exemplo, o óxido de zircônio que devido as suas propriedades, irá acrescentar ao suporte cromatográfico, resistência mecânica, resistência a variação de pH e de solventes e também resistência térmica, possibilitando uma maior gama de variações que podem ser feitas no método

utilizado, para alcançar melhores resultados. Em alguns casos o óxido de zircônio ( $ZrO_2$ ), assim como outros óxidos metálicos ( $Al_2O_3$ ,  $TiO_2$ ) são usados como suporte, substituindo a sílica, pois podem apresentar melhores características físico-químicas. (NAWROCKI, 1993; NAWROCKI, 2004; MORAIS, 2005).

As FE polares atualmente vêm sendo sintetizadas através de diversos métodos de síntese, tendo como base, geralmente, a sílica que possui propriedades interessantes para uma FE ou suporte cromatográfico. Dentre os métodos utilizados destacam-se os métodos sol-gel e impregnação com um alcóxido metálico. (NAZÁRIO, 2013; WANG, 2013; BENVENUTTI, 2009).

O método sol-gel é um dos mais utilizados e um dos mais simples, pois é feito em duas etapas: a formação do 'sol' onde o silicato utilizado vai ser hidrolisado formando uma solução contendo a sílica que em seguida vai reagir com o precursor metálico escolhido, o qual irá se ligar aos grupos silanóis da sílica (Figura 8) formando assim um 'gel', o mesmo depois vai ser seco para a obtenção da sílica modificada. (NAZARIO, 2013).

**Figura 8 - Esquema da ligação do metal à sílica através do grupo silanól.**



FONTE: Autor, 2019.

O método de impregnação com um alcóxido metálico vem sendo descrito na literatura por muitos pesquisadores para a deposição de espécies metálicas sobre a sílica com diferentes metais, como, zircônio, alumínio e titânio. Nesse tipo de síntese a sílica é ativada e misturada a uma solução com o alcóxido metálico formando uma camada do metal utilizada sobre a partícula da sílica. Esse processo é bastante utilizado e algumas variações são feitas no método de síntese de acordo com o alcóxido utilizado. (NAZÁRIO, 2013; GORAIEB, 2013, NAWROCKI, 2004).

Os diferentes métodos utilizados e os diferentes metais utilizados para modificar a sílica vão gerar FE com diferentes propriedades e diferentes áreas superficiais. Goraieb e colaboradores modificaram a sílica com três metais diferentes, obtendo com isso FE que mostraram diferenças em relação a eficiência cromatográfica, obtendo N/m (número de pratos teóricos por metro) que foi de aproximadamente 26000 para a sílica zirconizada, 68000 para a aluminizada e chegando a 69000 para a titanizada, mostrando que os diferentes precursores metálicos utilizados vão alterar a eficiência da FE. (GORAIEB, 2013).

Como trabalho desenvolvido visa a síntese de uma nova FE utilizando como base a sílica, a qual será modificada com uma mistura de óxidos ( $\text{Li}_2\text{O}$ ,  $\text{BaO}$  e  $\text{ZrO}_2$ ), a fim de se obter um óxido misto, a síntese deste material será feita utilizando o método de complexação metal-quitosana o qual é bastante utilizado na síntese de catalisadores. Nesse método os precursores metálicos são misturados e adicionados a uma solução de quitosana em meio ácido, complexando os metais a quitosana que posteriormente irá ser degradada a altas temperaturas formando poros no material final.

A quitina é um biopolímero de alto peso molecular, formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e é obtida em grande quantidade das conchas de crustáceos. A quitina é o material fonte da quitosana, sendo a quitosana um copolímero deacetilado da quitina, formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (VARMA, 2004, GUINESI, 2007).

A quitosana tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores devido a sua capacidade de formação de complexos com metais, e tem sido utilizada na síntese de materiais porosos e com grande área superficial, pois tem a capacidade de formar compostos esféricos, e por ser degradada no processo de calcinação formará, principalmente, mesoporos. O uso de quitosana com maior grau de polimerização pode resultar em materiais com maior resistência mecânica (BRAGA, 2009; SALGADO, 2015).

O mecanismo de complexação que forma a ligação entre a quitosana e o metal têm sido descrito de diferentes formas por diferentes pesquisadores, sendo os mecanismos conhecidos como "*pendant model*", onde é dito que a quitosana se liga

ao metal através de um dos seus grupamentos amino, e “*bridge model*”, que propõe que os íons metálicos são coordenados por vários grupos amino, são os mais discutidos (VIEIRA, 2005; VARMA, 2004).

O método de complexação metal-quitosana tem sido empregado, principalmente, na síntese de catalisadores, entretanto, o fato de produzir materiais com elevada área superficial e com boa resistência mecânica, torna o método viável para uso na síntese de óxidos metálicos para serem usados como FE em HPLC, visto que as propriedades acima citadas são de grande importância para uma FE.

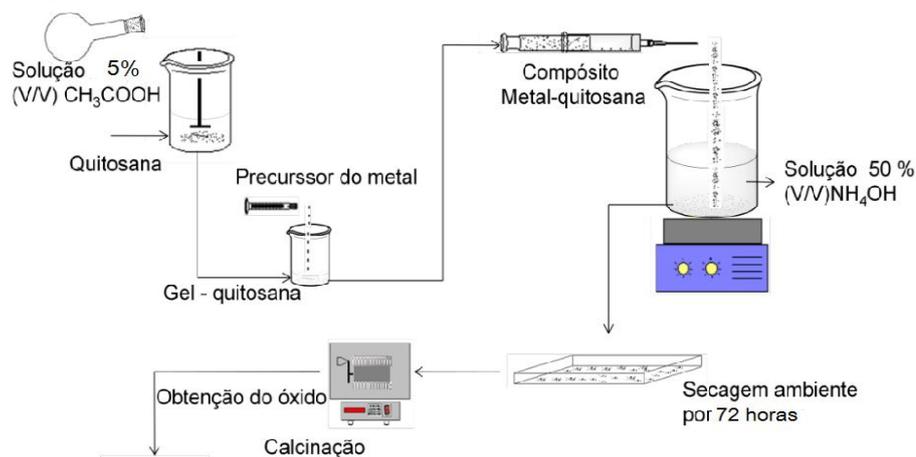
## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Síntese do óxido misto através do método da complexação metal-quitosana.

A óxido misto foi sintetizada, através da metodologia de complexação metal-biopolímero, onde os precursores metálicos utilizados foram:  $\text{SiO}_2$  (Sigma Aldrich),  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (Dinâmica P.A.),  $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$  (Dinâmica P.A.) e  $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich) gerando uma mistura com proporção molar de óxidos ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Li}_2\text{O}$ ,  $\text{ZrO}_2$  e  $\text{BaO}$ ) aproximada de 65%, 29%, 5% e 1% respectivamente. As proporções obtidas foram baseadas em trabalhos anteriores de SILVEIRA, 2001 e BORTOLUZZI, 2006.

Na metodologia utilizada foi pesado a quitosana de baixo peso molecular,  $100.000\text{-}300.000 \text{ g mol}^{-1}$  (Acros Organics), para a obtenção de uma proporção quitosana:óxidos na razão de 1:3. A quitosana foi colocada em um béquer de 250 mL e foi dissolvida com solução de ácido acético 5% (v/v), na sequência a mistura de sais foi dissolvida com água destilada e vertida na solução de quitosana, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um mixer (Britânia Ultra Mixer) devido a elevada viscosidade da mistura (Figura 9).

**Figura 9 - Adaptação da metodologia de síntese de Silveira e colaboradores.**



FONTE: Adaptado de Vallentini e colaboradores, 2001.

A mistura foi levada para a bomba peristáltica (Provitec, modelo DMGA 7900 TX-D) para ser gotejada em solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  50% (v:v) precipitando o complexo

formado pelos precursores metálicos com a quitosana em pequenas gotículas. Após a precipitação do complexo, o mesmo foi levado à capela por cerca de 72h para que a amônia evaporasse, logo após, esse material foi separado em frações que foram calcinadas separadamente com diferentes metodologias de calcinação.

#### 4.2. Planejamento experimental

A fim de se obter o material com as melhores características para ser usado como fase estacionária, como por exemplo, uma maior área superficial, foi feita uma avaliação dos parâmetros utilizados na calcinação, sendo eles: temperatura, taxa de aquecimento e tempo de permanência. Para essa avaliação foi realizado um planejamento experimental completo  $2^3$ , onde os 3 parâmetros citados foram variados em 2 níveis. Deste modo foi realizado o planejamento experimental em um total de 9 experimentos, 8 experimentos referente as avaliações dos parâmetros em 2 níveis, e 1 experimento referente ao ponto central, como mostrado na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2 - Tabela codificada do planejamento experimental.**

	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Taxa de aquecimento (°C min <sup>-1</sup> )
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9	PC	PC	PC

PC = Ponto Central

FONTE: Autor, 2019.

Após a realização dos experimentos, foi feito um estudo dos dados através do diagrama de Pareto, tomando como resposta para os 9 experimentos os resultados das caracterizações como, Adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> (BET) e análise termogravimétrica (TGA)

Os materiais calcinados foram separados por granulometria em peneiras (Bertel indústria metalúrgica) de 10, 45 e 100 µm. As diferentes granulometrias foram separadas em faixas de 45-100 µm e 10-45 µm para fazer a caracterização e para o empacotamento das colunas cromatográficas de CLC e HPLC.

### **4.3. Caracterização do material**

Foram selecionadas para a caracterização as partículas com granulometria entre 10-45 µm, as quais foram caracterizadas através das técnicas Difração de Raios X. (Shimadzu, modelo XRD 6000) localizado no Laboratório de Síntese se Catalisadores (LSCat), de Adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> (Quantachrome instrumentos modelo NOVA 2200e), Análise Termogravimétrica (TA, Discovery SDT-650) e FTIR (Thermoscientific, Nicolet IR200) localizado no grupo de catálise e reatividade química (GCaR).

#### **4.3.1. Difração de raios X (XRD)**

A análise de difração de raios X foi realizada para as amostras calcinadas a 350, 500 e 700 °C, através da aplicação da radiação CuK $\alpha$  com 30 KV de voltagem e corrente de 30 mA, com filtro de Níquel utilizando o método de pó. Os difratogramas foram obtidos na faixa de 2 $\theta$  de 10° a 90° com velocidade do goniômetro de 2 graus por minuto com passo de 0,02 graus.

#### **4.3.2. Adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>**

A caracterização da área superficial feita pelo método de BET foi realizada com um prévio tratamento térmico da amostra a 300 °C, por um período de 24h, para depois seguir para a análise da área superficial e volume de poro.

#### 4.3.3. Análise térmica (TGA)

As análises termogravimétricas foram feitas usando uma rampa de temperatura de 30 a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 20 °C por minuto em atmosfera inerte de nitrogênio com um fluxo de 20 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.3.4. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

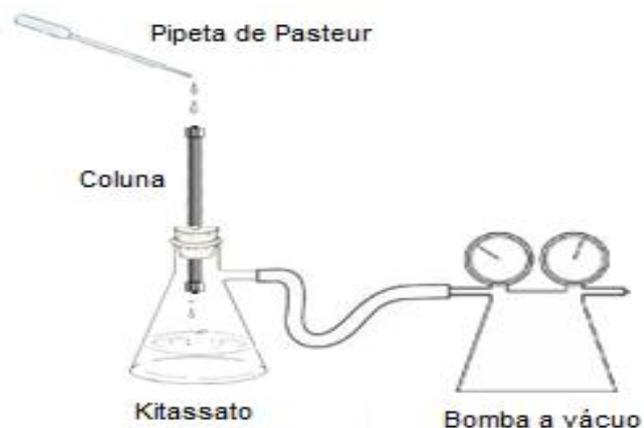
As análises de FTIR foram realizadas para analisar os grupos funcionais e ligações presentes nas estruturas dos materiais calcinados. A medida da transmitância foi realizada na faixa de comprimento de onda de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram maceradas e misturadas com KBr, a mistura foi prensada para formar uma pastilha, que foi, então, levada para o equipamento.

#### 4.4. Empacotamento da coluna cromatográfica (HPLC).

Para a realização do empacotamento da coluna cromatográfica as partículas do material escolhido foram ativadas em estufa (Quimis) a 150 °C por um período de 120 minutos para a retirada da água adsorvida na superfície das partículas, liberando os grupos silanóis para que possam interagir com os analitos. Em seguida foi feito o empacotamento da coluna cromatográfica (250 x 4,60 mm) usando um kitassato com uma bomba de vácuo (Millipore), com o auxílio de um septo para vedar a entrada do kitassato e segurar a coluna, como demonstrado na Figura 10. O material sintetizado foi misturado com hexano (Êxodo Científica, P.A.) formando uma mistura heterogênea que foi gotejada na coluna com uma pipeta de *pasteur*, tomando cuidado para que o sólido não secasse e rachasse a coluna devido a intercalação de camadas de ar.

Após o empacotamento, a coluna foi ligada a bomba do equipamento de HPLC Varian, com a saída da coluna indo para o descarte. Foi passado hexano e isopropanol pela coluna, com um aumento gradual do fluxo de FM para que fosse aumentada a pressão no interior da coluna, melhorando o empacotamento das partículas, permitindo que partículas muito pequenas, que possam ter ficado na peneira na separação granulométrica fossem tiradas da coluna.

**Figura 10 - Aparato utilizado no empacotamento da coluna cromatográfica.**



FONTE: Autor, 2019

#### **4.5. Testes cromatográficos (HPLC)**

Os testes cromatográficos foram realizados em equipamento de HPLC Varian ProStar equipado com detector UV-VIS Varian ProStar 325 e uma bomba ternária.

Os testes cromatográficos foram realizados em colunas empacotadas com os materiais calcinados a 350 e 700 °C (Colunas A350 e A700), escolhidos dentre os materiais sintetizados.

O primeiro teste cromatográfico realizado foi a separação de produtos oriundos da oxidação do álcool benzílico, o qual foi feito em ambas as colunas cromatográficas. Para este teste foram utilizados quatro padrões analíticos na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ : álcool benzílico, ácido benzoico, benzaldeído e benzofenona.

Inicialmente foi utilizado como fase móvel água:acetonitrila ( $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ ) para a análise destes padrões nas duas colunas, com um fluxo de fase móvel de 1  $\text{mL min}^{-1}$  com a coluna em temperatura ambiente, usando um detector UV com comprimento de onda ajustado em 254 nm o qual foi chamado Método A (Tabela 3).

**Tabela 3 - Gradiente de eluição, inicial usado na análise dos compostos oriundos da oxidação do álcool benzílico.**

Tempo (min)	Método A		Método B	
	%H <sub>2</sub> O	%ACN	%Hexano	%Isopropanol
0:01	40	60	40	60
15:00	20	80	20	80
17:00	40	60	40	60

FONTE: Autor, 2019.

A segunda metodologia (Método B) foi testada somente na coluna A700 onde mudou-se a fase móvel para uma fase móvel normalmente utilizada em NPLC, diferente da FM típica de HILIC utilizada anteriormente para avaliar se a coluna apresentaria melhores resultados. Para isso foi utilizada uma FM composta por hexano:isopropanol usando o mesmo gradiente descrito na Tabela 3.

Após os resultados dos primeiros testes cromatográficos foi feita uma otimização do método HILIC para a coluna A700. A fim de se obter uma melhor separação foi variada a proporção de fase móvel utilizada na coluna A700, de forma que o gradiente de eluição composto por água:acetonitrila, passou a ser realizado de forma isocrática (Método C), ou seja, com uma proporção de solventes fixa na composição da fase móvel, usando ACN:H<sub>2</sub>O, 95:5 por 20 minutos.

#### **4.5.1. Otimização do método cromatográfico (HPLC)**

O Método C, passou por uma otimização, onde foi feita uma avaliação univariada de 3 parâmetros do método cromatográfico, a fim de se obter valores ótimos para essas 3 variáveis (temperatura da coluna, fluxo de FM e composição da FM) e consequentemente uma melhor eficiência cromatográfica.

#### **4.5.2. Otimização da temperatura da coluna**

O primeiro dos três parâmetros avaliados foi a temperatura da coluna. Para este teste foi utilizado um forno varian. As temperaturas avaliadas foram: temperatura ambiente; 30,0; 32,5; 35,0; 37,5 e 40,0 °C. Nessa avaliação foi variada

apenas a temperatura, mantendo todos os outros parâmetros do método cromatográfico inalterados.

#### 4.5.3. Otimização do fluxo de fase móvel.

O Fluxo de FM foi o segundo parâmetro a ser avaliado de forma univariada onde fixou-se a temperatura em 35 °C e os fluxos avaliados foram 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.5.4. Otimização da composição de fase móvel.

Por fim foi avaliada a proporção dos solventes ACN e H<sub>2</sub>O na fase móvel, também de forma univariada fixando-se a temperatura em 35 °C e o fluxo em 1 mL min<sup>-1</sup>. As proporções de ACN:H<sub>2</sub>O testadas foram: 90:10, 93:07, 95:05, 96:04 e 97:03. Foi também avaliado o uso de gradiente da FM onde foram usadas as proporções de ACN e H<sub>2</sub>O descritas na Tabela 4. O mesmo gradiente foi utilizado nas análises com ácido tetrafluoracético (TFA) (0,1%) na FM.

**Tabela 4 - Proporção de acetonitrila e água utilizadas no gradiente de eluição dos compostos derivados do ácido benzóico.**

Tempo (min)	% ACN	% H <sub>2</sub> O
0:01	97	03
5:00	95	05
15:00	95	05
20:00	97	03

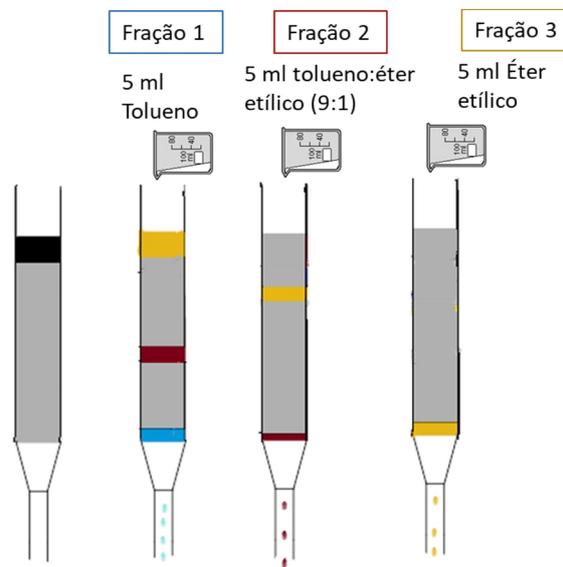
FONTE: Autor, 2019.

#### 4.6. Cromatografia líquida clássica (CLC)

Para o empacotamento das colunas de CLC foram selecionadas as partículas com tamanho de 45-100 µm e empacotadas em uma coluna de vidro. Em CLC tentou-se separar mono, di e triacilglicerídeos (MAG, DAG e TAG respectivamente) de uma amostra de óleo transesterificado contendo estes compostos, segunda uma metodologia proposta por Quinlin e colaboradores, que fizeram essa separação utilizando sílica pura.

Para este teste o material (A350) foi disperso em clorofórmio e em seguida empacotado em uma pipeta de vidro onde foi colocado primeiramente um algodão na ponta, para evitar perda de FE, em seguida foi adicionada a amostra contendo MAG, DAG e TAG. Para realizar a eluição destes compostos foram utilizados diferentes solventes, como mostrado na Figura 11.

**Figura 11 - Diferentes solventes utilizados na cromatografia líquida clássica para eluição dos diferentes grupos de analitos.**



FONTE: Autor, 2019.

As frações foram coletadas em alíquotas de 1 mL, num total de 5 alíquotas para cada uma das FM utilizadas na eluição dos analitos, para que dessa forma fosse melhor observada a eluição de cada analito individualmente.

As frações obtidas na separação de MAG, DAG e TAG por CLC, foram colocadas na capela em temperatura ambiente para que houvesse a evaporação dos solventes utilizados para a eluição dos analitos. Após a total evaporação destes solventes, foram adicionados 100  $\mu$ L da fase móvel utilizada no método de HPLC em cada um dos frascos contendo as frações eluídas da coluna.

Para a análise destas frações foi utilizada uma coluna de fase reversa, C18 (Macherey-Nagel) com dimensões de 250 x 4,6 mm, ou seja, foi utilizado o modo RPLC. O método cromatográfico utilizado para essas análises foi proposto por

Carvalho e colaboradores, utilizando como fase móvel metanol e uma mistura de hexano:isopropanol, em um gradiente de eluição (Tabela 5), com tempo total de análise de 23 minutos, usando um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e detector UV com comprimento de onda em 254 nm.

**Tabela 5 - Método cromatográfico utilizado para a separação de MAG, DAG e TAG.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>% Metanol</b>	<b>% Isopropanol:Hexano (5:4 v:v)</b>
<b>0:01</b>	100	0
<b>10:00</b>	50	50
<b>15:00</b>	50	50
<b>17:00</b>	100	0
<b>23:00</b>	100	0

FONTE: Autor, 2019.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Síntese dos óxidos mistos.**

O óxido misto foi obtido após a síntese e calcinação, onde foi obtido um pó de cor acinzentada, o qual foi separado por peneiras granulométricas, onde foi percebido que a maior parte do material sintetizado se encontrou na faixa de tamanho de partícula de 45-100  $\mu\text{m}$ , devido a isso foi escolhido inicialmente essa faixa de tamanho de partículas para os primeiros testes cromatográficos em HPLC e CLC. Também foi obtido uma boa quantidade (cerca de 30%) de material com tamanho de partículas na faixa de 10-45  $\mu\text{m}$ , o qual também foi usado como fase estacionária em HPLC.

### **5.2. Planejamento experimental**

Para a otimização da calcinação do material sintetizado foram realizados 9 experimentos (Tabela 2, pg. 38), onde foi variada temperatura (350, 550 e 750  $^{\circ}\text{C}$ ), taxa de aquecimento (3, 6 e 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) e tempo de calcinação (180, 300 e 420 min). Como resposta a esse planejamento experimental, foi inicialmente utilizado os resultados das caracterizações dos mesmos.

#### **5.2.1. Adsorção de $\text{N}_2$ (BET)**

A área superficial é um bom indicador para esses experimentos, pois quanto maior a área superficial maior a interação da FE com os compostos analisados, possibilitando uma melhor separação. Logo, a área superficial indicará se o material será ou não uma boa FE em HPLC. Assim foram feitas as análises de área superficial de cada material por BET (Tabela 6).

**Tabela 6 - Resultados das áreas superficiais obtidas paa os experimentos do planejamento experimental. T = temperatura, TA = taxa de aquecimento e tP = tempo de permanência.**

AMOSTRA	T (°C)	TP (h)	TA (°C min <sup>-1</sup> )	ÁREA SUPERFICIAL (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
Exp 1	350	3	3	220
Exp 2	350	3	10	95
Exp 3	350	7	3	30
Exp 4	350	7	10	24
Exp 5	750	3	3	14
Exp 6	750	3	10	27
Exp 7	750	7	3	---
Exp 8	750	7	10	---
Exp 9 (PC)	550	5	7	---

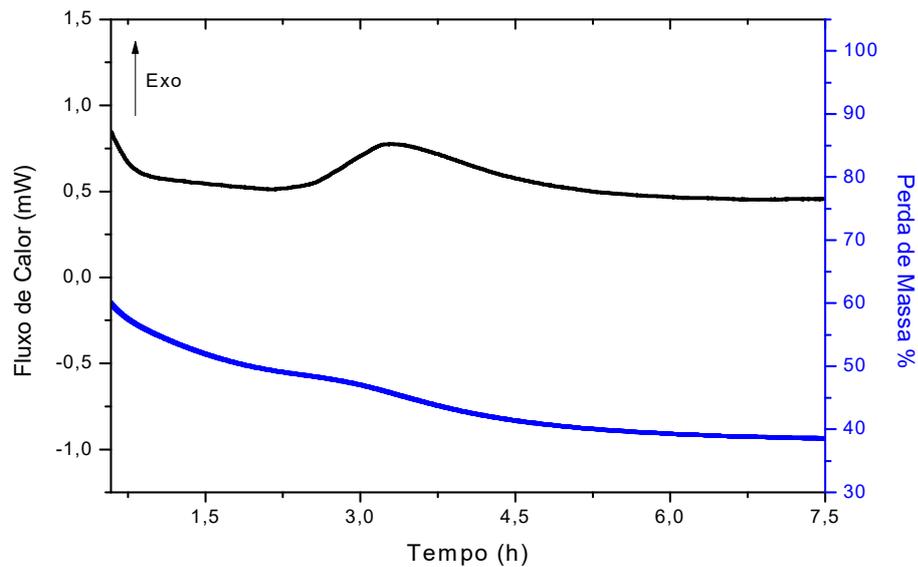
FONTE: Autor, 2019.

Nas amostras relacionadas aos experimentos 7, 8 e 9 não foi possível observar a área superficial, por isso não foi possível gerar o gráfico de pareto para esta resposta. Entretanto é possível observar através dos resultados obtidos que há o indicativo de que quanto maior a temperatura utilizada no processo de calcinação, menor é a área superficial do material, o que pode estar associado ao processo de sinterização das partículas, visto que maiores temperaturas favorecem a agregação de partículas, formando uma partícula maior, reduzindo, assim, a área superficial do material. Através dos resultados apresentados na Tabela 5 é possível observar que o parâmetro taxa de aquecimento tem uma influencia bastante significativa na área superficial final, uma vez que com uma taxa de aquecimento de 3 °C min<sup>-1</sup> a 350 °C foi obtido um material com área superficial de 220 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, enquanto que alterando a taxa de aquecimento para 10 °C min<sup>-1</sup> houve um decréscimo da área superficial do material para 95 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

Da mesma forma o tempo parece apresentar uma influencia bastante significativa, sendo que o menor tempo de calcinação (3h) mostrou melhores resultados em comparação com os materiais onde esse tempo foi aumentado, o que poderia significar que o sólido analisado estaria sofrendo alterações em sua estrutura ao longo da calcinação, mostrando assim diferentes resultados quando comparado com materiais calcinados por menos tempo.

Para avaliar essas possíveis reações ao longo do tempo de calcinação, foi feita uma simulação da calcinação em um analisador térmico à 350 °C e mantendo em isoterma por 7,5 h, com intuito de observar, por meio de análise calorimétrica diferencial, se estaria ocorrendo alguma modificação no material (Figura 12).

**Figura 12 - Análise de termogravimétrica com isoterma de 450 minutos para simular calcinação e análise de DSC para avaliação das reações ocorridas durante a calcinação.**



Na Figura 12 é possível observar que na curva de DSC, há um sinal referente a uma reação exotérmica acontecendo no material, próximo a 3h de calcinação, Mostrando que ainda está ocorrendo modificações na estrutura do material após 3h de calcinação. Essa reação é confirmada na curva de TGA, onde tem-se um declínio próximo a 200 min, mostrando que ainda houve perda de massa mesmo mantendo a temperatura estável em 350 °C, o que pode ser a causa da diferença de área superficial entre os materiais com diferentes tempos de calcinação.

### 5.2.2. Análise termogravimétrica TGA

A outra caracterização realizada para estes experimentos foi à análise termogravimétrica, para que fossem observadas as perdas de massa desses materiais (Figura 13), que podem estar associadas a perda de água adsorvida, degradação de matéria orgânica que não tenha sido eliminada na calcinação ou outros processos como oxidação e cristalização (IONASHIRO, 2004).

Nas análises de TGA é visto que há uma maior perda de massa relacionada a degradação da matéria orgânica para amostras calcinadas a menores temperaturas (Tabela 7), o que é coerente, visto que quanto maior a temperatura, mais rapidamente a matéria orgânica vai ser degradada na calcinação. Essa matéria orgânica também pode estar associada à área superficial obtida nas amostras, pois matérias carbonadas tendem a apresentar uma maior área superficial, entretanto essa matéria orgânica pode ser problemática para uma FE, visto que pode interagir de forma irreversível com os analitos.

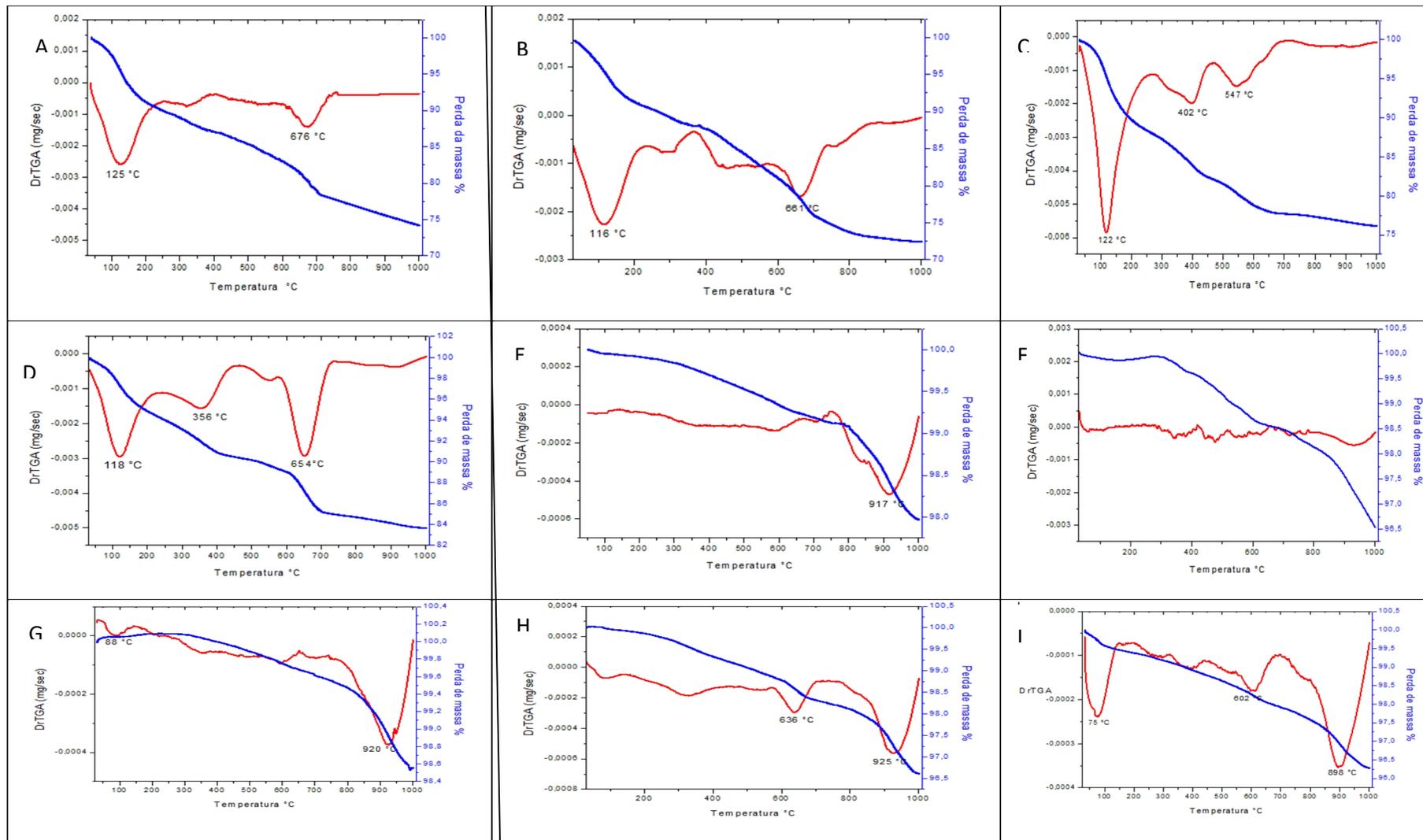
Logo, uma menor quantidade de matéria orgânica no material final é desejável, para isso então, foram escolhidos valores intermediários de taxa de aquecimento ( $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) e tempo de calcinação (4h), para otimizar o processo de calcinação, com base nos resultados de área superficial (Tabela 6) e da simulação da calcinação (Figura 12), usando duas temperaturas diferentes ( $350\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com base nos resultados de TGA (Figura 13), para avaliar a influencia da matéria orgânica na eficiência da FE.

**Tabela 7 - Perdas de massa obtidas das análises termogravimétricas.**

Amostras	Perda de Massa Total (%)	Eliminação de Água (%)	Degradação de MO (%)
EXP 1	25,74	9,17	16,57
EXP 2	26,95	8,16	18,82
EXP 3	23,69	11,34	12,32
EXP 4	16,21	5,51	10,7
EXP 5	2,02	---	---
EXP 6	3,44	---	---
EXP 7	1,44	---	---
EXP 8	3,38	---	---
EXP 9 (PC)	3,63	---	---

FONTE: Autor, 2019.

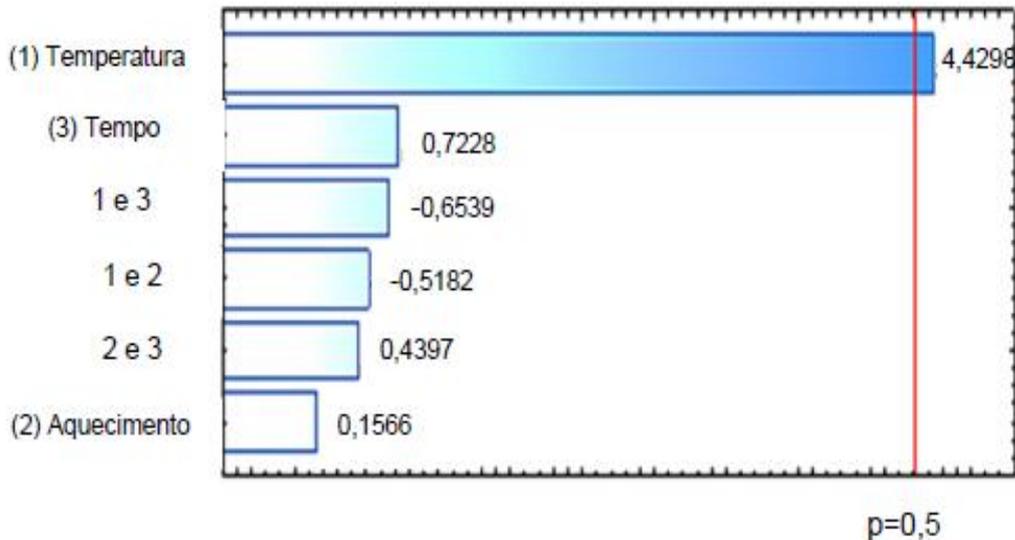
Figura 13 - Termogramas das amostras Exp 1(A) , Exp 2(B), Exp 3(C), Exp 4(D), Exp 5(E), Exp 6 (F), Exp 7(G), Exp 8(H) e Exp 9(I).



FONTE: Autor, 2019.

Com os resultados das perdas de massa obtidos no TGA, foi construído o diagrama de Pareto, para observar a influencia desses parâmetros sobre a perda de massa dos materiais (Figura 14).

**Figura 14 - Diagrama de Pareto obtido utilizando como resposta a perda de massa dos materiais obtidos por análise termogravimétrica.**



FONTE: Autor, 2019.

Através do diagrama de Pareto observa-se que a única variável significativa na degradação de matéria orgânica presente no material é a temperatura, de forma que, quanto maior a temperatura menor será a quantidade de MO residual.

### **5.3. Caracterizações das fases estacionárias selecionadas para os testes cromatográficos (A350 e A700)**

Através dos resultados obtidos com o planejamento experimental foram calcinadas duas fases estacionárias, uma a 350 °C e outra a 700 °C, para comparar a influencia da presença de matéria orgânica no material final. Como foi observado no planejamento experimental que apenas a variável temperatura tinha influencia significativa nas respostas, e que o material ainda estava sofrendo modificações após os 180 min de calcinação, foi fixado 240 min de tempo de permanência e 5 °C min<sup>-1</sup> de taxa de aquecimento para otimizar o tempo de calcinação.

As FE selecionadas para os testes cromatográficos foram caracterizadas por TGA, Adsorção de N<sub>2</sub> (BET), DRX e FTIR. Desta forma foi possível comprovar a

presença dos óxidos sintetizados, bem como suas características de área superficial e porosidade.

### 5.3.1. Fase estacionária A350

Inicialmente foi usada a FE A350 que foi calcinada a 350 °C por 4h a uma taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>. Esse material foi escolhido por ter apresentado uma maior área superficial, em comparação aos demais materiais sintetizados. A FE A350 foi inicialmente caracterizada por Adsorção de N<sub>2</sub> (BET) (Figura 15-D) para verificar a sua área superficial, mostrando uma área superficial relativamente alta, 285 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> quando em comparação com a literatura onde se encontram FE comerciais com área superficial de 100 m<sup>2</sup> g.

Em relação à quantidade de matéria orgânica determinada por TGA, foi observada uma diminuição, em comparação com os experimentos anteriores, sendo observados uma perda de massa total de aproximadamente 15%, sendo 10,5 % (260 e 607 °C) referentes a MO (Figura 15-A). Na análise de FTIR (Figura 15-B) foi obtido um espectro característico de silicatos, onde foi possível observar as bandas referentes a ligação O-H das hidroxilas (3000-3500 cm<sup>-1</sup>) que serão os sítios ativos dessa FE e uma banda intensa entre 1000-1100 cm<sup>-1</sup> que é da ligação Si-O-Si, indicando que houve a formação do material desejado. Nas análises de DRX também foi possível comprovar a formação do material desejado, através das presenças de todos os óxidos metálicos utilizados, incorporados à sílica (SILVEIRA, 2001) (Figura 15-C).

### 5.3.2. Fase estacionária A700

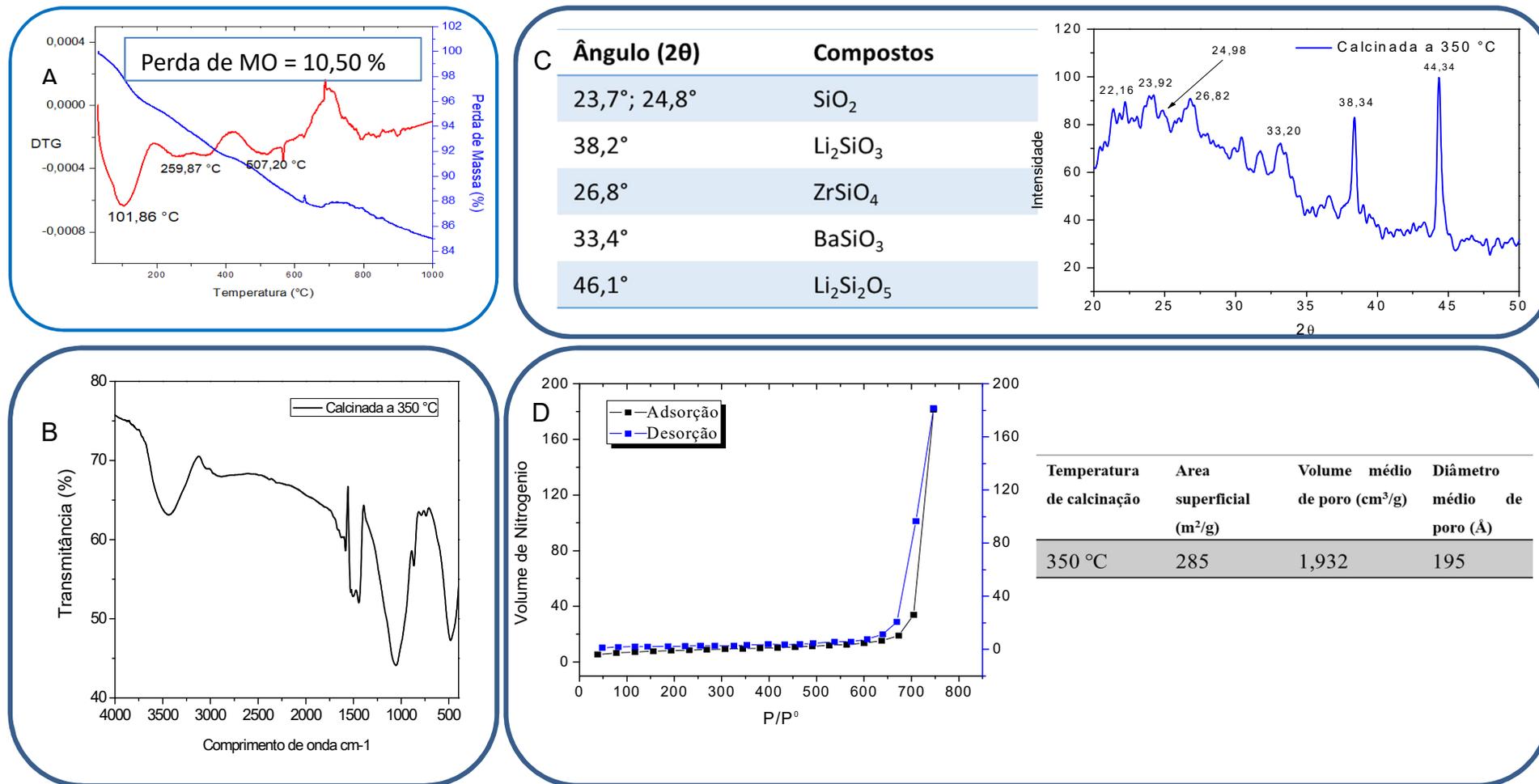
Com a FE A700 seguiu-se o mesmo procedimento de calcinação da A350 mudando apenas a temperatura final, que foi de 700°C, para assim eliminar completamente a matéria orgânica contida no material.

A escolha desta FE se deu justamente para se avaliar a viabilidade ou não desse material conter matéria orgânica em sua composição quando for utilizado como FE, já que as maiores áreas superficiais, como na FE A350, foram obtidas para materiais contendo matéria orgânica não degradada na sua composição o que pode ser problemático por que pode causar interferência na interação dos analitos

com a FE. Esse material foi então caracterizado pelas mesmas técnicas que a FE A350.

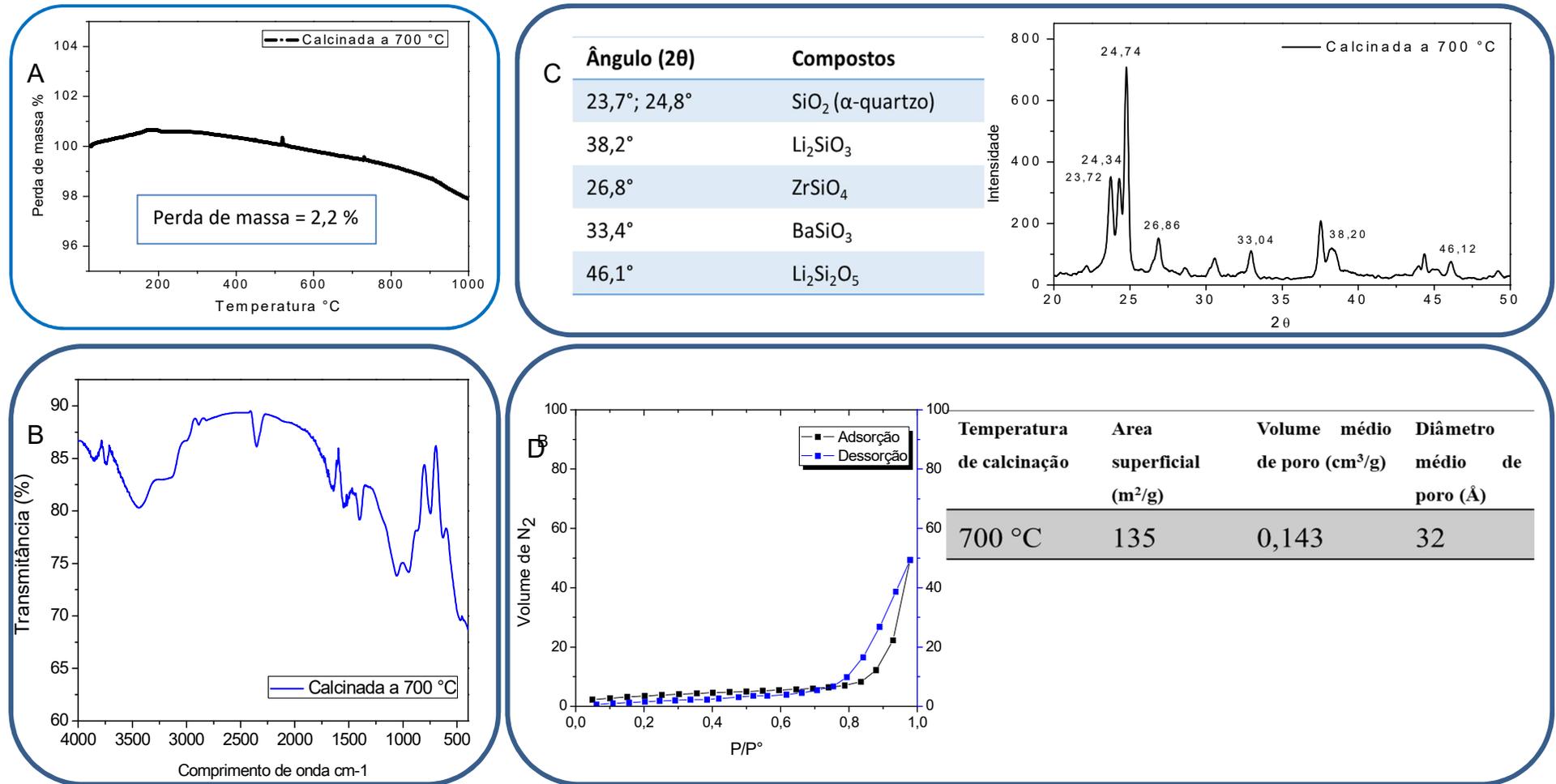
Como era esperado, foi observado pela análise térmica (Figura 16 - A) que não existe resquícios de matéria orgânica no material final, onde foi encontrada a perda de massa de apenas 2,2% o que pode estar relacionado a humidade do material. Pela análise de FTIR foi observado um espectro característico de silicatos, onde pode-se observar a banda característica da ligação Si-O-Si ( $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ ) e a banda referente a ligação OH das hidroxilas ( $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ ) o que indica a formação dos compostos desejados (Figura 16 - B). Por DRX foram observados os sinais referentes aos óxidos metálicos incorporados à sílica, sendo, dessa forma, comprovada a caracterização deste material quando comparado com a literatura (SILVEIRA, 2001) (Figura 16 - C). Por fim, através da análise por adsorção de  $\text{N}_2$ , observou-se uma área superficial bastante inferior a da FE A350, de  $135 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , o que era esperado devido ao aumento da temperatura de calcinação (Figura 16 - D), porém como explicado anteriormente, na literatura encontram-se FE comerciais com área superficial menor ( $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) do que a observada para o material A700, tornando ambos os materiais, A350 ( $285 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e A700 ( $135 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), promissores para testes cromatográficos.

Figura 15 - Resultados das caracterizações para a fase estacionária A350, calcinada a 350 °C. (A) TGA, (B), FTIR, (C) DRX e (D) BET.



FONTE: Autor, 2019.

Figura 16 - Resultados das caracterizações para a fase estacionária A350, calcinada a 350 °C. (A) TGA, (B), FTIR, (C) DRX e (D) BET.



FONTE: Autor, 2019.

#### **5.4. Empacotamento da coluna cromatográfica**

Os materiais sintetizados que foram utilizados com FE, foram empacotados da mesma forma em uma coluna cromatográfica com medidas de 250 x 4,6 mm. Após o empacotamento ter sido realizado a coluna foi colocada no HPLC passando FM em fluxos crescentes, dessa forma foi garantido o empacotamento das partículas e foi possível observar que não estava havendo a saída da FE da coluna à medida que a FM era passada. Em seguida a coluna foi aberta para a visualização do nível de FE, onde foi observado que não houve alteração, mostrando que o empacotamento da coluna foi realizado com êxito.

#### **5.5. Testes cromatográficos (HPLC)**

As análises de HPLC foram feitas com quatro tipos diferentes de FE, sendo que inicialmente as proporções de óxidos foram fixas em 65% SiO<sub>2</sub>, 29% Li<sub>2</sub>O, 5% BaO e 1% ZrO<sub>2</sub>. Os primeiros materiais foram usados em uma faixa de tamanho de partícula entre 45-100 µm, pois foi a faixa de tamanho de partícula obtida em maior quantidade. Os dois primeiros materiais testados foram calcinados a 350 °C, sendo o primeiro com um tamanho de partícula na faixa de 45-100 µm (A350), faixa de tamanho de partículas obtida em maior quantidade, e o segundo com tamanho de partícula entre 10-45 µm (B350).

O terceiro material testado foi calcinado a 700 °C e foi escolhido porque apesar de apresentar uma área superficial mais baixa, não mostrou a presença de matéria orgânica na sua composição, diferente do material usado na coluna A350 e B350, que foi escolhido por apresentar uma maior área superficial. Isso serviu para avaliar se o fato de a FE utilizada possuir matéria orgânica influenciará de forma positiva ou negativa na eficiência cromatográfica da coluna. Para essa coluna foi dado o nome de A700 (45 – 100 µm) .

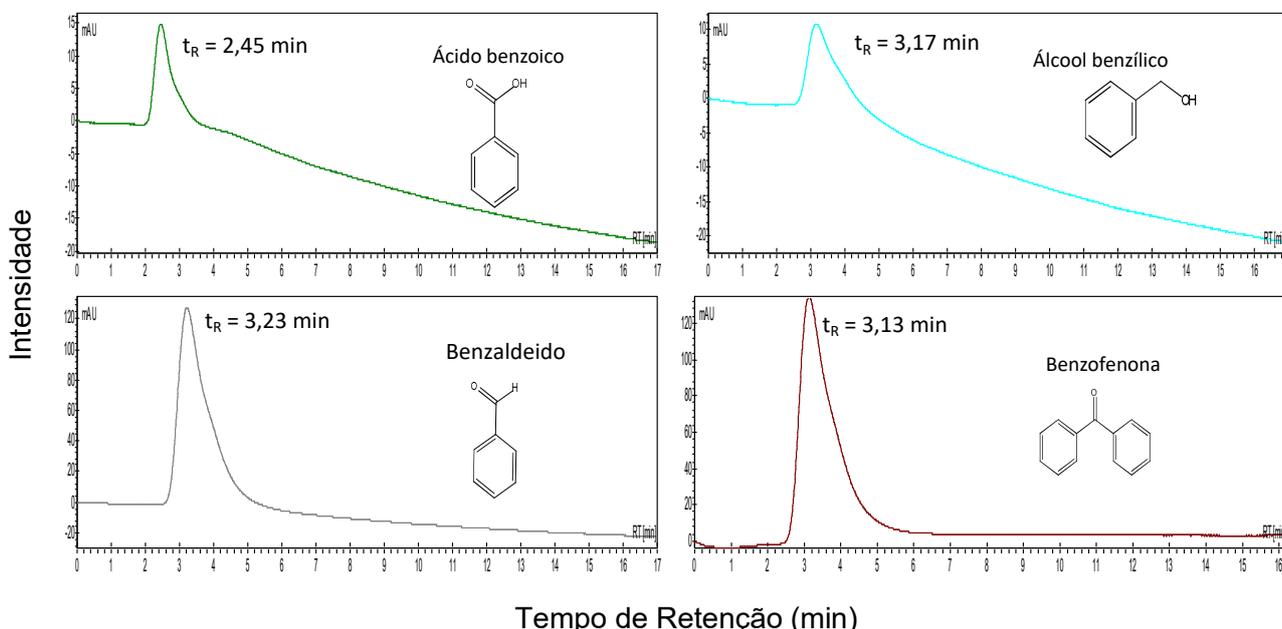
O quarto material testado foi calcinado da mesma forma que o material A700. Entretanto esse material passou por uma nova separação granulométrica, onde foi obtido um material com tamanho de partículas em uma faixa de 10–45 µm (B700), com o intuito de aumentar a interação da FE com os analitos melhorando a eficiência do material.

### 5.5.1. Testes cromatográficos na coluna A350

#### 5.5.1.1. Padrões de oxidação do álcool benzílico

Os primeiros testes cromatográficos realizados na coluna A350 foram feitos com compostos oriundos da oxidação do álcool benzílico (Figura 17) com os parâmetros do método A descrito na parte experimental. Para isso foram utilizados quatro padrões analíticos (benzofenona, ácido benzoico, benzaldeído e álcool benzílico). Os analitos foram analisados individualmente, para observar o tempo de retenção de cada um.

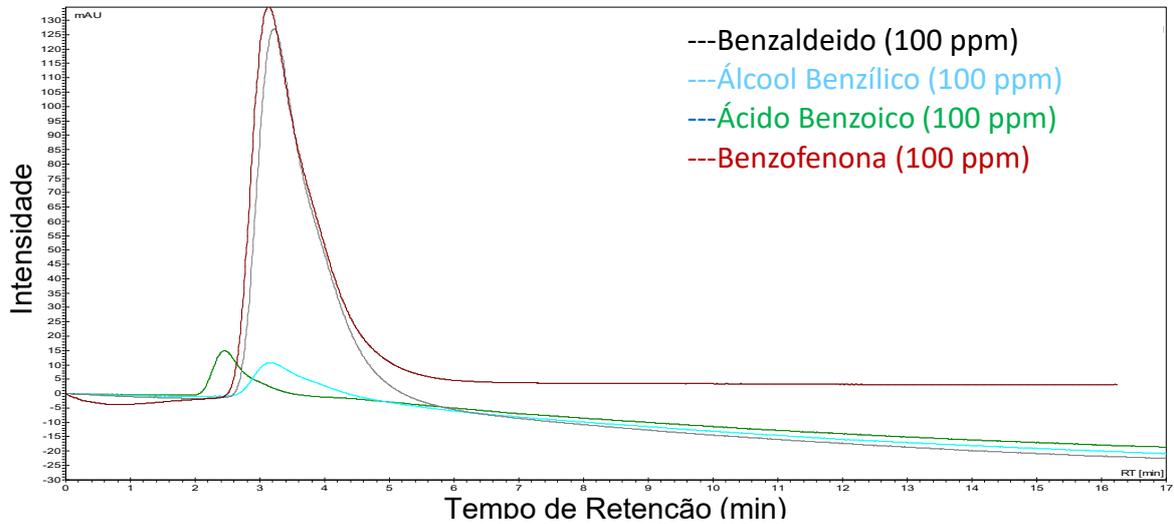
**Figura 17 - Cromatogramas dos padrões analíticos, ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona obtidos com a fase estacionária A350.**



FONTE: Autor, 2019.

Como observado nos cromatogramas, os tempos de retenção dos analitos foram muito próximos uns dos outros, e a largura apresentada pelos picos, como nos cromatogramas dos compostos benzofenona e benzaldeído, contribuem para que haja coeluição dos compostos, como se pode observar na sobreposição dos cromatogramas individuais (Figura 18).

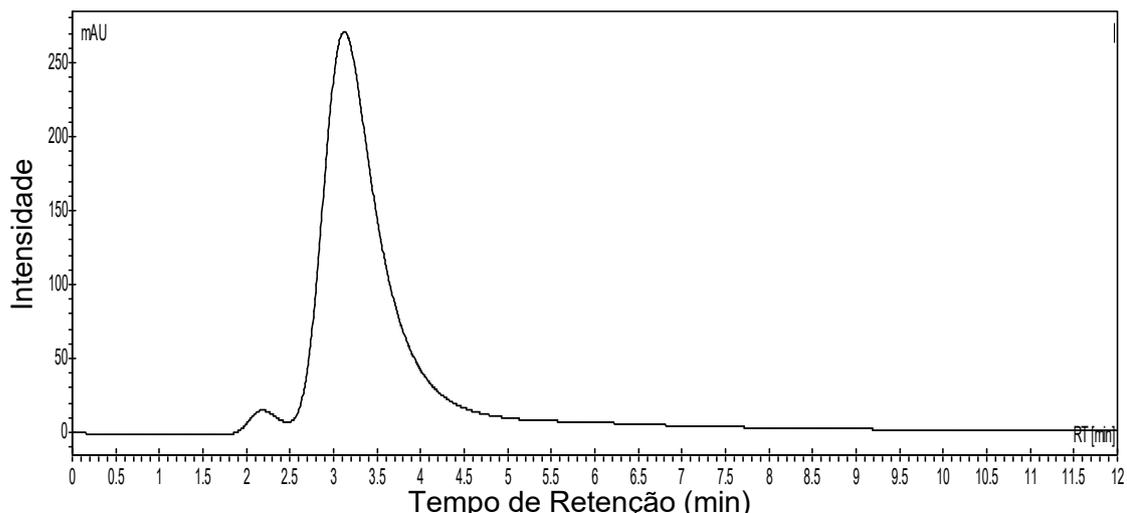
**Figura 18 - Sobreposição dos cromatogramas individuais dos produtos da oxidação do álcool benzílico na fase estacionária A350.**



FONTE: Autor, 2019.

Na Figura 18 pode-se notar a coeluição de 3 dos 4 padrões analíticos, sendo possível observar apenas dois picos, o que pode ser melhor observado no cromatograma da mistura destes 4 compostos (Figura 19), ou seja, existe a coeluição dos analitos álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona sendo possível separar apenas o ácido benzoico dos demais.

**Figura 19 - Cromatograma da mistura dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona obtido com a fase estacionária A350.**



FONTE: Autor, 2019.

Os baixos tempos de retenção obtidos para estes compostos (entre 2 e 5 min) pode ser devido a faixa de tamanho de partículas de 45-100  $\mu\text{m}$  que é considerado

grande para uma coluna de HPLC onde normalmente usam-se 5  $\mu\text{m}$ . Dessa forma os compostos eluem muito rápido, não interagindo de forma eficiente com a FE como deveriam e isso associado à difusão dos compostos na coluna, por não ter uma pressão alta o suficiente para manter a banda do analito estreita dentro da coluna, fazem com que a eficiência cromatográfica seja baixa. O problema da difusão poderia então, ser resolvido com o aumento do fluxo, e consequentemente aumento da pressão, mas devido ao tempo de retenção ser muito baixo, isso faria com que os analitos eluíssem todos juntos, não sendo observada nenhuma separação entre os compostos.

Para então avaliar a eficiência da coluna nesse primeiro teste, foram avaliados alguns parâmetros como, número de prato teórico (N), altura do prato teórico (H) e assimetria de pico (Tabela 8).

**Tabela 8 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica A350. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As).  $t_R$ = tempo de retenção,  $W_b$ = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.**

Padrões Analíticos	Número de pratos teóricos (N) $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico (H) $H = L / N$	Assimetria do pico (As) $As = B / A$
Benzaldeído	92,91	0,27	2,89
Benzofenona	83,42	0,30	3,11
Álcool benzílico	89,29	0,28	2,38
Ácido benzoico	163,22	0,15	2,55

FONTE: Autor, 2019

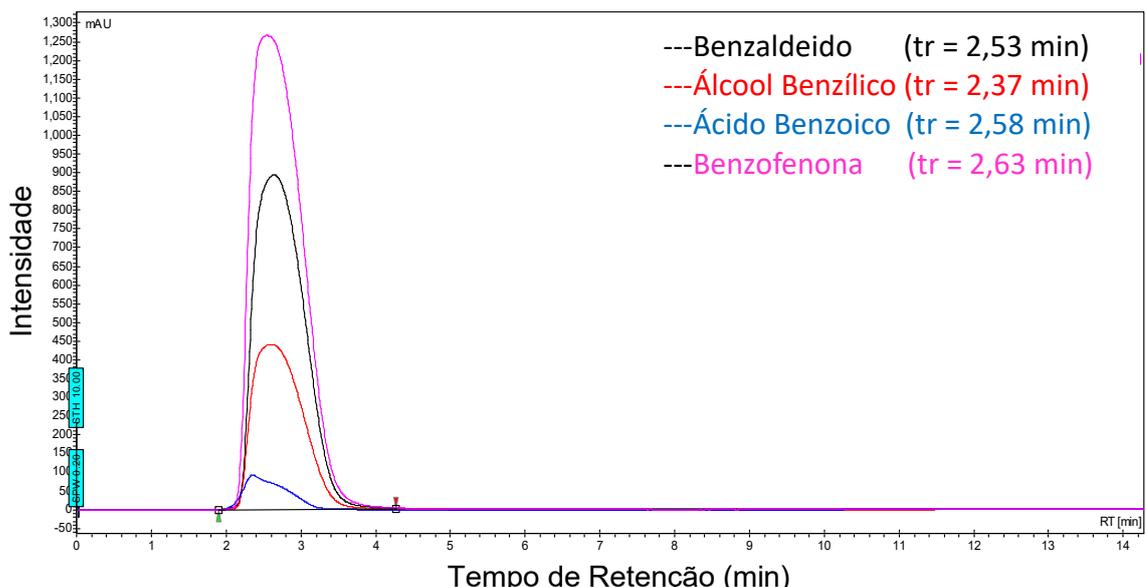
O número de pratos teóricos calculado individualmente para cada composto nessa coluna se mostrou muito baixo em comparação com colunas comerciais, mostrando a baixa eficiência desse material, com esse tamanho de partícula para análises em HPLC. Foi observado também que a altura do prato teórico foi alta, visto que a literatura traz que a altura deve estar abaixo de 0,15 sendo esse valor obtido apenas para o ácido benzoico. A assimetria de pico, também, mostra a ineficiência da coluna, uma vez que, valores altos de assimetria de pico (valores considerados bons devem estar na faixa de 0,8 a 1,2) indicam a presença de caudas nos picos, o

que demonstra a difusão dos analitos na coluna, bem como a interação excessiva. Como o tempo de retenção dos compostos é baixo, eluindo logo no começo da análise, pode-se dizer que a assimetria é causada pela difusão, e não por interação excessiva.

### 5.5.2. Testes cromatográficos na coluna A700

Os testes cromatográficos na coluna A700, onde a FE não possui matéria orgânica, foram realizados com os mesmos padrões analíticos (Figura 20) testados na coluna A350, utilizando o método A, com gradiente de água e acetonitrila, e o mesmo tamanho de partícula utilizado inicialmente na coluna A350 (45-100  $\mu\text{m}$ ). Com estas análises pode-se comparar os resultados obtidos em ambas as colunas.

**Figura 20 - Sobreposição dos cromatogramas individuais dos padrões ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeido e benzofenona na coluna A700, utilizando como fase móvel um gradiente de acetonitrila e água.**

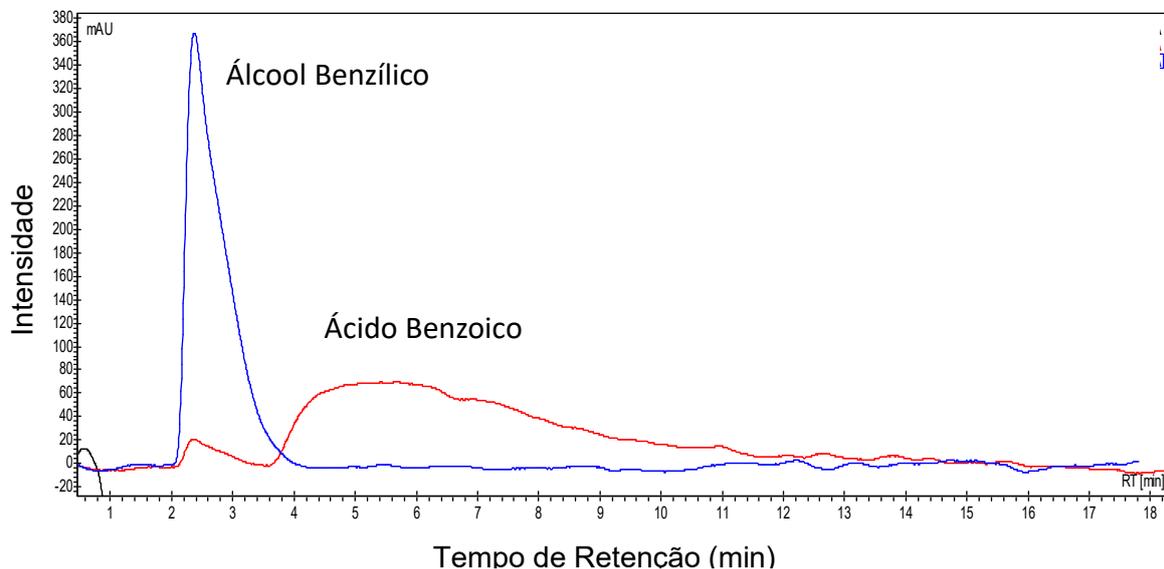


FONTE: Autor, 2019.

Após as análises individuais dos quatro padrões analíticos foi observada a coeluição de todos os compostos, pois todos eluíram no mesmo tempo de retenção (Figura 20). Este teste indicou que a presença de matéria orgânica na coluna A350 ajudou na separação dos compostos analisados, pois foi possível observar a presença de dois picos, diferentemente de apenas 1 na coluna A700 que não tem MO, mostrando que houve interação dos analitos com a FE, mesmo que não tenha sido de forma eficiente.

Como o modo HILIC, aparentemente, não funcionou nesta coluna (coeluição dos 4 compostos), a FM foi mudada para hexano:isopropanol, ou seja, uma FM móvel típica do modo NPLC (método B). Apenas a FM foi mudada, mantendo todos os outros parâmetros do método B iguais. Neste método foram apenas analisados os compostos mais polares (ácido benzoico e álcool benzílico) (Figura 21), visto que compostos muito polares podem apresentar problemas de separação em colunas polares no modo NPLC, devido à possibilidade de interação excessiva ou mesmo ligações irreversíveis.

**Figura 21 - Cromatograma dos compostos ácido benzoico e álcool benzílico no modo NPLC com a fase estacionária A700.**



FONTE: Autor, 2019.

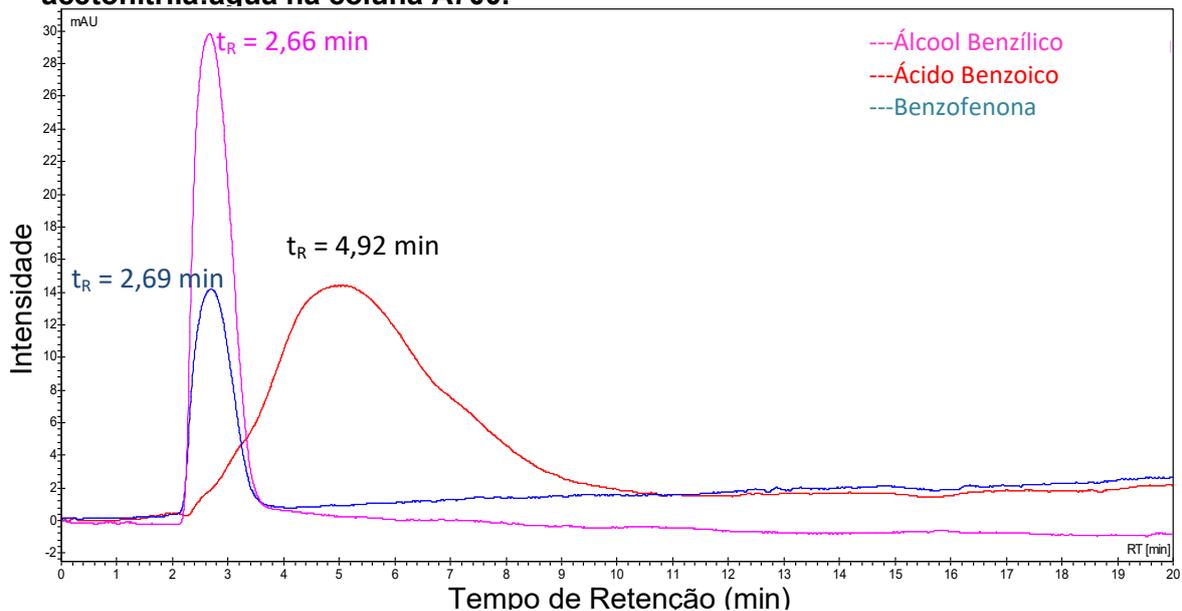
Os cromatogramas apresentados na Figura 21 mostram uma interação excessiva do composto mais polar (ácido benzoico) com a FE, resultando em um pico demasiadamente alargado, mostrando que o modo NPLC não é o mais indicado para ser utilizado com essa FE na separação de compostos muito polares, entretanto a separação de compostos pouco polares pode não ser satisfatória, visto que o álcool benzílico, que é um composto polar, eluiu com um tempo de retenção baixo.

Na sequência foi mudada a proporção dos solventes da FM utilizada para 95% acetonitrila e 5% água e usada de forma isocrática (método C), com o objetivo de aumentar o tempo de retenção dos compostos com a diminuição da porcentagem

de água. Pois a literatura indica que a redução da proporção de água, diminui a camada rica em água adsorvida na FE, aumenta as interações adsorptivas da FE sobre o analito e aumenta o tempo de retenção do mesmo.

Assim foi feita a análise dos compostos benzaldeído, álcool benzílico e ácido benzoico utilizando o método C (Figura 22).

**Figura 22 - Cromatogramas dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico e benzaldeído no método isocrático usando a proporção 95:5 de acetonitrila:água na coluna A700.**



FONTE: Autor, 2019.

Com a mudança no método cromatográfico a separação do ácido benzoico dos demais compostos (Figura 22) foi superior aos outros métodos, eluindo com um tempo de retenção maior que os demais, mostrando que a diminuição da proporção de água colaborou para o aumento das interações adsorptivas do analito com FE, obtendo-se um pico mais estreito e mais simétrico (Tabela 9), mostrando que a FE A700 é mais apropriada ao uso no modo HILIC do que no modo NPLC.

**Tabela 9 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica A700. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.**

Compostos Orgânicos	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $As = B / A$
Benzaldeído	87,77	0,28	1,52
Benzofenona	83,07	0,30	1,56
Álcool benzílico	88,18	0,28	1,15
Ácido benzoico	18,60	1,34	1,99

FONTE: Autor, 2019.

Através da avaliação da eficiência da coluna para os compostos analisados, pode-se observar que foi obtido um menor número de pratos teóricos para o ácido benzoico em comparação com a coluna A350 (Tabela 8), mas o tempo de retenção foi maior, mostrando um aumento na interação entre analito e FE, o que indica que a ausência de MO nesta FE possibilitou uma maior interação analito-FE, devido, provavelmente, a maior disponibilidade de grupos Si-OH no material. Todos os analitos apresentaram valores de assimetria de pico menores na coluna A700 (Tabela 9) deixando os picos mais bem resolvidos.

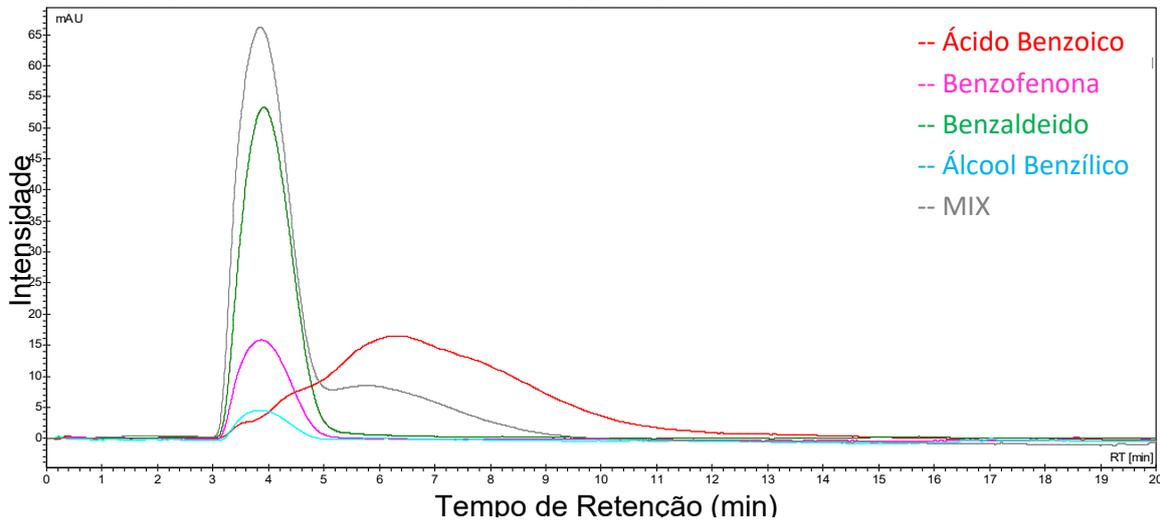
### 5.5.3. Testes cromatográficos na coluna B700 .

Com os resultados dos primeiros testes cromatográficos realizados nas duas colunas, foi visto que a coluna A700 teve uma melhor eficiência quando usada com FM com menor proporção de água e de forma isocrática. Como também foi observado uma melhor simetria dos picos, na coluna A700 utilizando o método C, logo foi escolhida a FE calcinada a 700 °C, inicialmente, para realizar os testes cromatográficos com a faixa de tamanho de partículas menor, dessa vez foi usada a FE com partículas em uma faixa de 10-45 µm.

Os mesmos padrões foram injetados na coluna cromatográfica para observar o tempo de retenção de cada um, e em seguida foi feita a análise da mistura desses padrões (Figura 23) utilizando o método C, onde foi utilizada uma FM com 95%

acetonitrila e 5% de água, mantendo o fluxo de 1 mL por minuto e temperatura ambiente.

**Figura 23 - Sobreposição dos cromatogramas individuais da mistura dos padrões analíticos ácido benzoico, álcool benzílico, benzofenona e benzaldeído utilizando a coluna B700 com tamanho de partícula de 10-45 micrometros.**



FONTE: Autor, 2019.

Com a diminuição do tamanho de partícula dessa FE foi observado, principalmente a mudança no tempo de retenção dos compostos, tendo um acréscimo desse tempo em todos os compostos, o que já era esperado, pois, com a diminuição do tamanho de partícula da FE aumenta-se a área superficial e com isso espera-se que haja uma maior interação dos analitos com a FE, o que ficou comprovado com o aumento destes tempos de retenção.

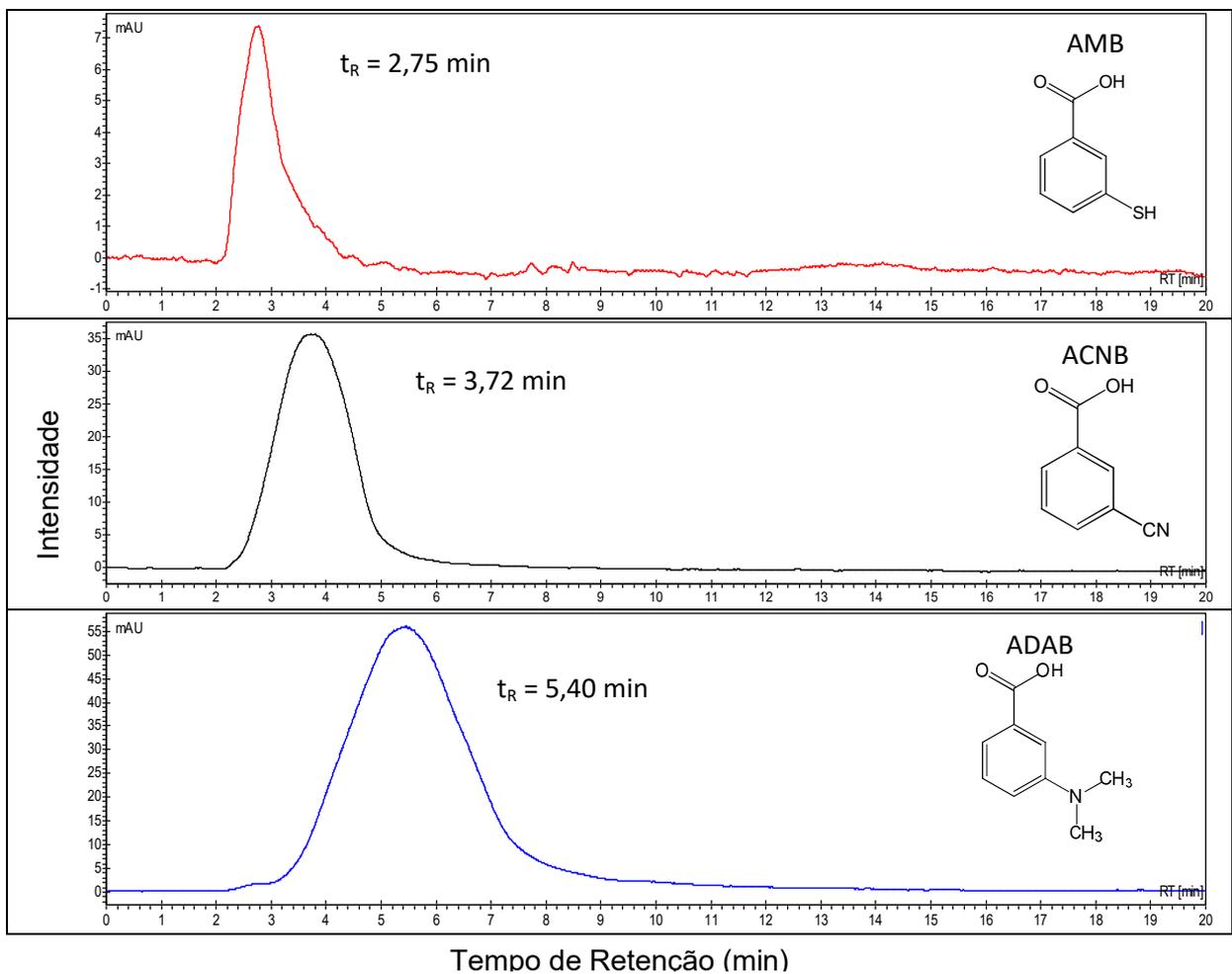
Entretanto não foi observado uma melhor separação dos compostos, como pode-se observar pela sobreposição dos cromatogramas individuais na Figura 23, o que é comprovado com a injeção da mistura dos compostos onde observa-se apenas 2 picos.

Como o ácido benzoico foi o composto que apresentou o maior tempo de retenção entre os compostos analisados, pode-se inferir que este é o que está apresentando uma maior interação com a FE, devido a isso, foi realizado um novo teste cromatográfico na coluna B700 onde foi utilizado o mesmo método cromatográfico, com outros padrões analíticos derivados do ácido benzoico, visto este ter tido a maior interação com a FE. Neste teste foram utilizados os compostos

ácido 4- mercaptolbenzoico (AMB), ácido 3-cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico (ADAB).

Os analitos foram analisados individualmente, onde foram determinados os tempos de retenção dos mesmos, e observou-se que houve uma pequena diferença nos tempos (Figura 24). Desta forma foi observado que os compostos foram eluídos na seguinte ordem de eluição  $AMB < ACNB < ADAB$ .

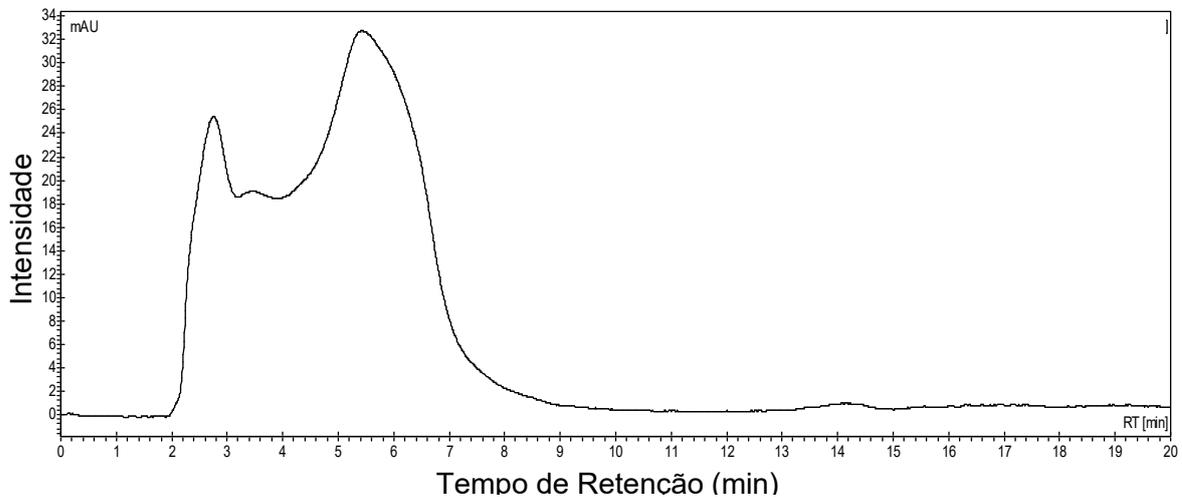
**Figura 24 - Cromatogramas individuais dos compostos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) com a fase estacionária B700.**



FONTE: Autor, 2019

Essa diferença nos tempos de retenção dos compostos mostra que há uma separação entre esses compostos e para comprovar essa separação, foi analisada a mistura destes compostos, de forma a observar se haveria o aparecimento de 3 picos, referentes a eluição dos analitos em tempos de retenção diferentes (Figura 25).

**Figura 25 - Cromatograma da mistura dos padrões analíticos ácido 3-mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700.**



FONTE: Autor, 2019.

Na análise da mistura dos padrões analíticos foi observado a presença de três picos, porém é visto que não há uma boa resolução entre eles. Esta baixa resolução está de acordo com os resultados das análises dos compostos individuais, pois, através dessas análises foi observado que os picos apresentaram-se muito largos, o que faz com que haja essa baixa resolução dos picos na análise da mistura de padrões. Dessa forma pode-se dizer que há a presença destes analitos na amostra, ou seja, pode ser feita a análise qualitativa ( $R_s < 1,25$ ) porém ainda não é possível analisar de forma quantitativa ( $R_s > 1,25$ ).

Na Tabela 10 estão representados os parâmetros usados para avaliar a eficiência da coluna, que, como pode-se observar, apresentam baixos valores de número de pratos teóricos para a análise de cada um dos compostos, assim como altura de prato teórico fora dos valores aceitáveis, entretanto pode-se observar que os valores de assimetria de pico para os compostos ACNB e ADAB estão com valores dentro do que se considera ideal ( $A_s < 1,5$ ).

**Tabela 10 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria**

Compostos Orgânicos	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $As = B / A$
AMB	98,76	0,25	2,21
ACNB	39,30	0,63	1,16
ADAB	33,87	0,73	1,14

FONTE: Autor, 2019.

A largura dos picos pode estar associada, ainda, a difusão dos analitos na coluna devido ao tamanho de partículas utilizado na FE, o que pode ainda ser melhorado para a obtenção de maior eficiência nas análises, pois como descrito por McCALLEY a eficiência de colunas de sílica têm sua eficiência aumentada conforme é diminuído o diâmetro das partículas da FE. Associado a isso também há o fato de que análises no modo HILIC possuem a tendência de apresentar picos mais largos devido a difusão dos analitos na coluna.

Essa difusão característica do modo HILIC é devido a FM utilizada. Como a FM apresenta um alto teor de solvente orgânico, mais de 90%, e a densidade destes compostos são menores em relação a FM aquosas, há uma diminuição na pressão da coluna cromatográfica, o que faz que a banda dos analitos dentro da coluna seja alargada.

## 5.6. Otimização do método cromatográfico

Com o intuito de otimizar o método cromatográfico, foram feitos testes com a FE B700 e os padrões analíticos AMB, ACNB e ADAB, para melhorar a separação dos mesmos aumentando a resolução dos picos.

A otimização deste método foi feita de forma univariada, ou seja, variando os parâmetros individualmente com o intuito de observar a influência da variação deste parâmetro na eficiência cromatográfica da FE. Assim será possível obter a valores ótimos de fluxo, temperatura da coluna e proporção de solventes na FM,

possibilitando uma melhor separação dos analitos e podendo passar de uma análise qualitativa para uma quantitativa.

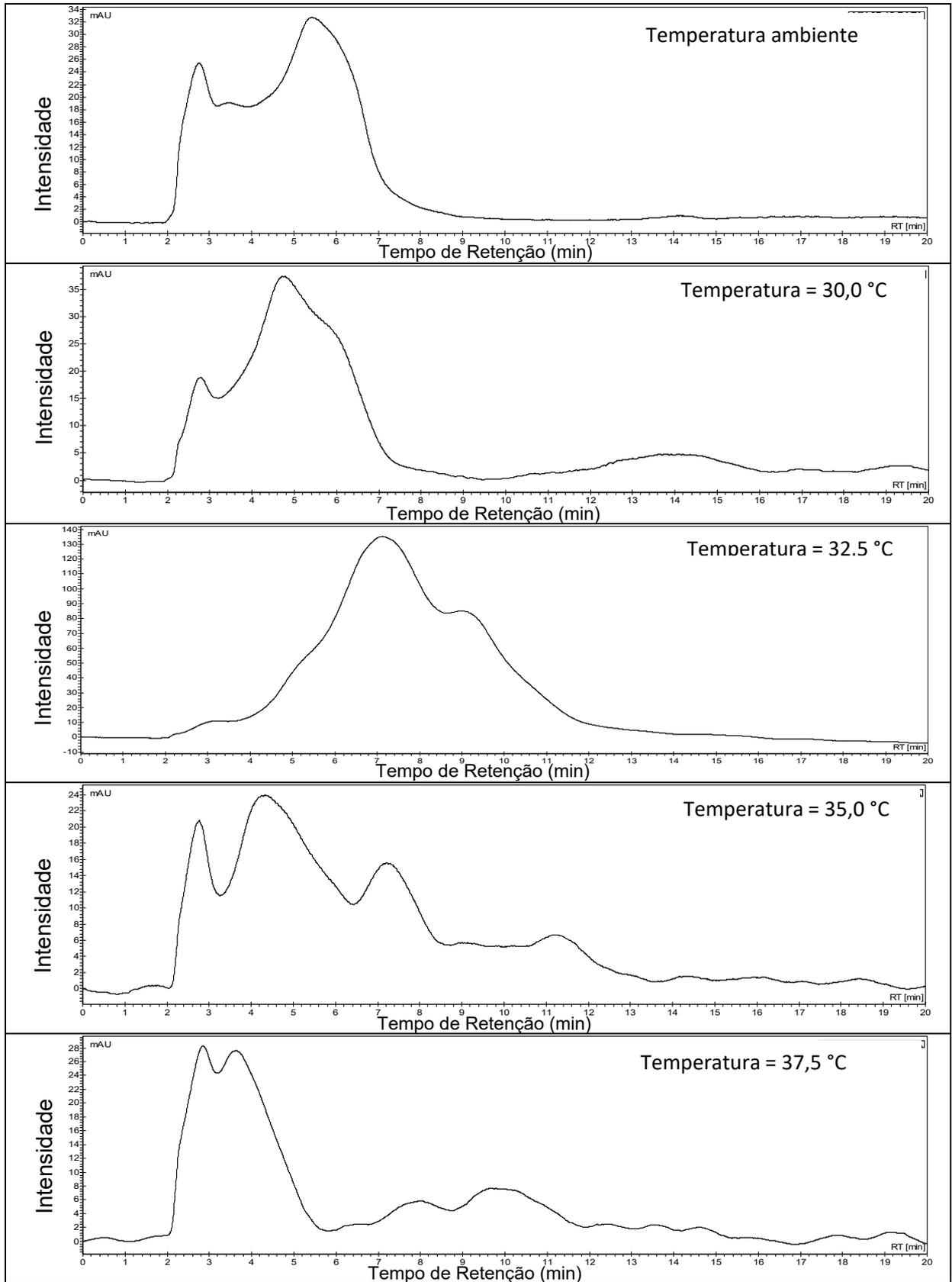
#### **5.6.1. Avaliação da temperatura da coluna**

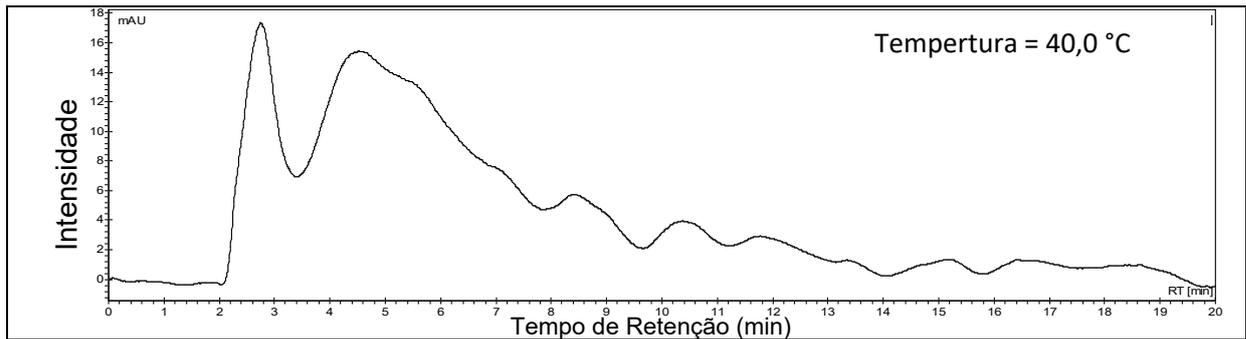
O primeiro parâmetro avaliado foi a temperatura da coluna, a qual foi avaliada em 6 pontos, da temperatura ambiente até 40 °C. Para essa avaliação foi utilizada apenas a mistura dos 3 padrões analíticos (AMB, ACNB e ADAB), uma vez que a ordem de eluição dos analitos é conhecida e está representada na Figura 24. Apesar de a temperatura poder alterar o tempo de retenção e a resolução dos picos, não afetará a ordem de eluição destes compostos.

As análises das misturas em cada uma das temperaturas testadas foram realizadas utilizando diferentes quantidades dos padrões, para dessa forma compensar a diferença de seletividade do detector de UV para os 3 padrões analíticos. O comprimento de onda utilizado de 254 nm é fixo durante toda a análise, e cada composto tem seu máximo de absorção em diferentes comprimentos de onda, o que faz que a resposta do detector seja diferente para cada composto, uma vez que as espécies químicas analisadas podem absorver a radiação UV emitida no comprimento de 254 nm de forma mais intensa que as outras, resultando em picos de intensidades diferentes entre os analitos, mesmo que analisados na mesma concentração.

A avaliação da temperatura teve como principal objetivo melhorar a resolução entre os picos cromatográficos, visto que os mesmos estavam alargados, mas foi notado também um aumento no tempo de retenção dos compostos com esse aumento da temperatura até 35,0 °C(Figura 26), porém, o que geralmente se observa com o efeito da temperatura sobre o tempo de retenção é a sua diminuição, devido a diminuição da viscosidade da FM. Mas o aumento do tempo de retenção neste caso não se torna incoerente, pois já é reportado na literatura por McCalley que o aumento da temperatura em colunas de sílica, utilizando o modo HILIC, resulta em um aumento do tempo de retenção para alguns compostos, entretanto o motivo pelo qual isso ocorre ainda não é claro, não sendo encontradas explicações concretas para esse fenômeno.

Figura 26 - Cromatogramas da avaliação de temperatura da coluna para os padrões AMB, ACNB e ADAB, utilizando fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e fase móvel com 95:5 de ACN:H<sub>2</sub>O Na coluna B700.





FONTE: Autor, 2019.

Com os resultados das análises em diferentes temperaturas, foi notado que houve um aumento do tempo de retenção dos analitos até os 35,0 °C, após isso o tempo de retenção foi diminuído, mostrando que para esse método os melhores resultados são obtidos com a temperatura da coluna em 35,0 °C, pois, como é possível observar no cromatogramas os 3 picos cromatográficos tiveram a melhor resolução, sendo possível observar claramente a presença dos 3 compostos. Portanto a temperatura de 35 °C foi fixada para avaliação dos outros parâmetros de forma univariada.

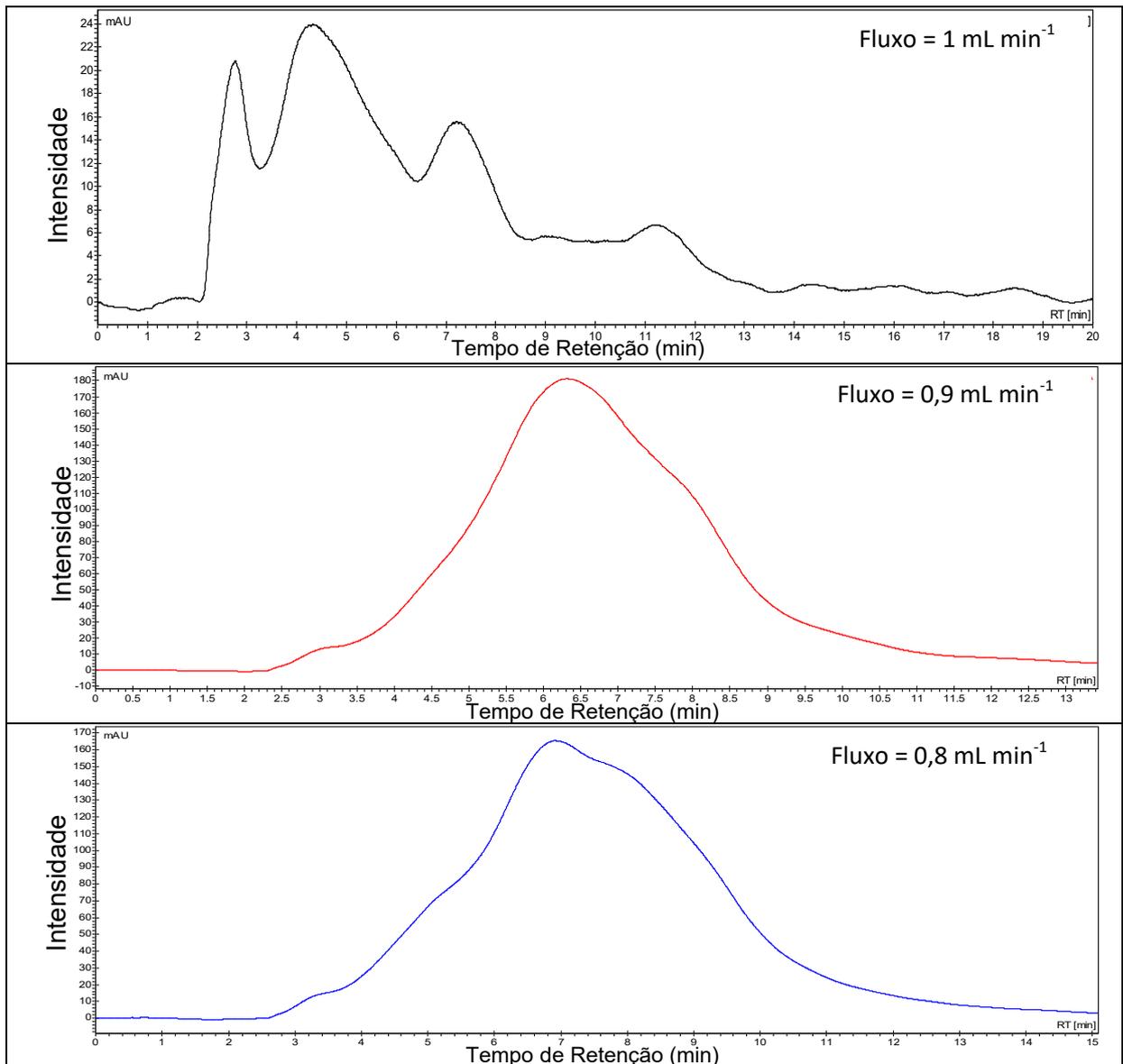
### 5.6.2. Avaliação do fluxo de fase móvel

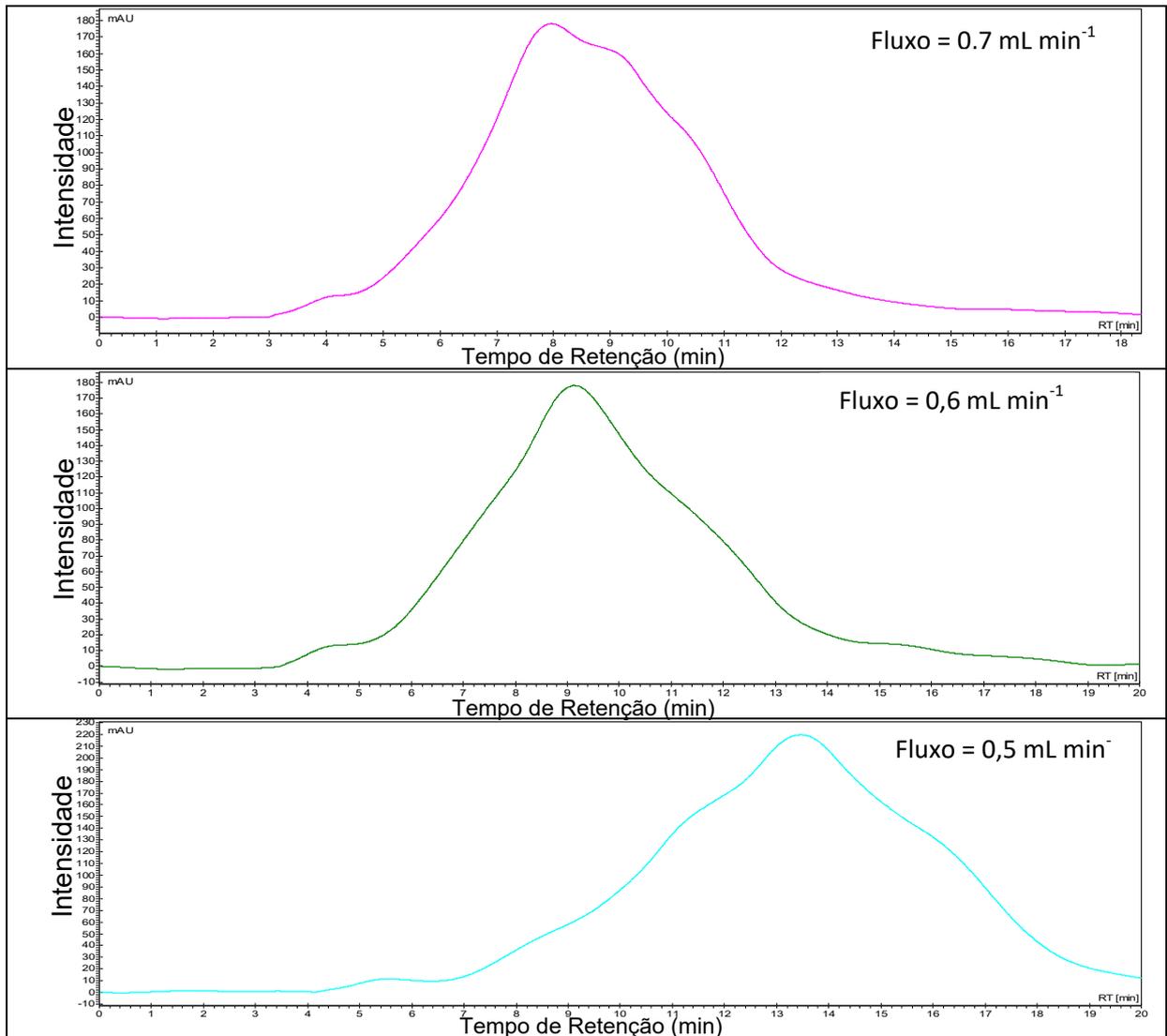
O próximo parâmetro avaliado no método foi o fluxo de FM de 1,0 até 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Nesta avaliação a principal mudança esperada na análise é a mudança do tempo de retenção dos compostos, pois com a variação do fluxo haverá a variação do tempo de retenção proporcional a mudança ocorrida no fluxo, por exemplo, se um analito tem um tempo de retenção de 5 minutos a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, espera-se que com a diminuição do fluxo pela metade, ou seja, para 0,5 mL min<sup>-1</sup>, haja o aumento do tempo de retenção do analito.

Como a alteração do fluxo não irá mudar a ordem de eluição dos analitos estudados, visto que a alteração do fluxo apenas aumentará ou diminuirá o tempo de retenção de todos os analitos. Mas o fato de a diminuição do fluxo colaborar para um maior tempo de permanência dos compostos na coluna cromatográfica, fará com que haja, possivelmente, uma maior interação dos analitos com a FE, melhorando a separação dos compostos e resultando em uma maior eficiência cromatográfica.

Deste modo as análises foram realizadas com a injeção da mistura dos padrões analíticos nos diferentes fluxos testados (Figura 27). A temperatura da coluna para este teste foi mantida em 35 °C, visto este ter sido o melhor resultado obtido na otimização da temperatura. Os demais parâmetros foram mantidos inalterados.

**Figura 27 - Cromatogramas da avaliação de fluxo para os padrões AMB, ACNB e ADAB Na coluna B700. T = 35 °C e FM = ACN:H<sub>2</sub>O (95:05)**





FONTE: Autor, 2019.

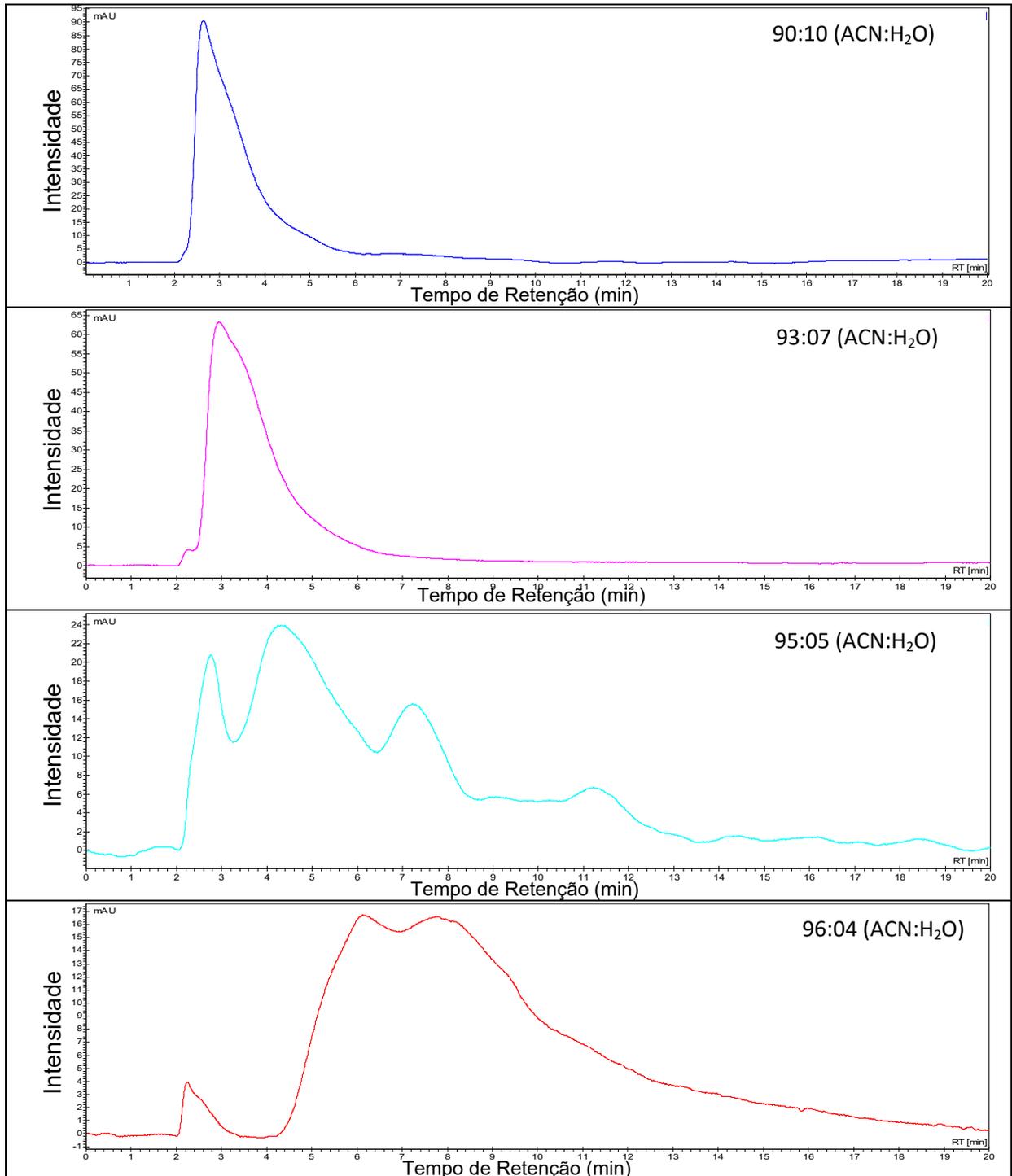
A avaliação de fluxo mostrou que fluxos menores que  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  não resultam em melhores separações, mesmo com o aumento do tempo de permanência destes compostos na coluna, mas, pelo contrário, fazem com que não haja nenhuma separação, pois devido a diminuição do fluxo, há um aumento na difusão das bandas dos analitos na coluna, resultando em picos extremamente alargados. Dessa forma pode-se inferir que o fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  é o melhor valor encontrado até o momento para essas análises, pois é possível visualizar a separação destes compostos com a utilização deste fluxo no método cromatográfico.

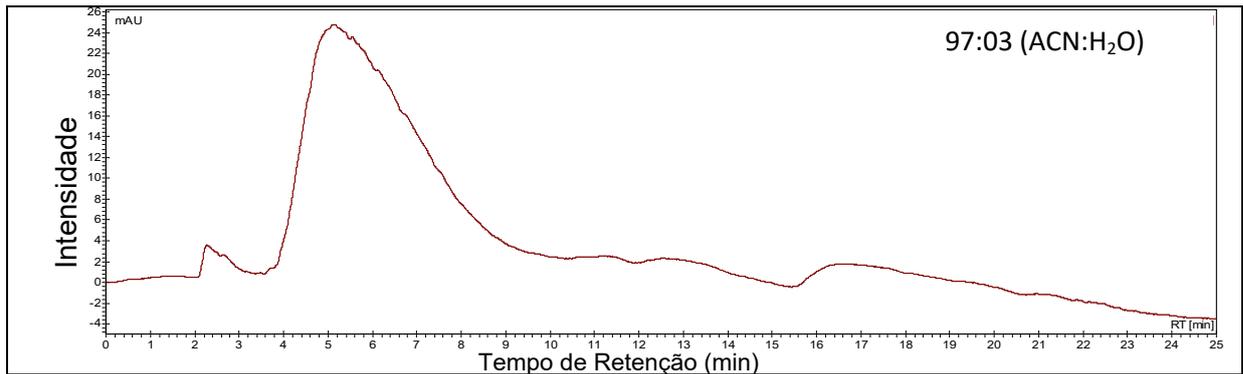
### 5.6.3. Avaliação da proporção de fase móvel.

Por fim foi feita a avaliação da proporção de solventes na fase móvel, com o intuito de avaliar se o aumento ou diminuição da proporção de água na FM iria afetar

a separação dos analitos de forma a melhorar a resolução dos picos. A avaliação foi feita de forma univariada, onde mantiveram-se fixos os valores de fluxo ( $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) e temperatura ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) avaliados anteriormente e a proporção de ACN:H<sub>2</sub>O foi avaliada em 5 pontos, indo de 90:10 até 97:03 (ACN: H<sub>2</sub>O) (Figura 28).

**Figura 28 - Avaliação da proporção de solventes da fase móvel na coluna B700. T= 35 °C, Fluxo = 1 mL min<sup>-1</sup>.**





FONTE: Autor, 2019.

Com o aumento da quantidade de água na FM é observado a presença de um único pico, como pode ser visto na Figura 28. A medida que a quantidade de água diminui e é aumentada a porcentagem de ACN, observam-se novos picos, como já é possível observar na proporção de ACN:H<sub>2</sub>O 93:07. Com a proporção de ACN:H<sub>2</sub>O 95:05 pode-se observar a presença dos 3 picos cromatográficos referentes aos padrões analíticos AMB, ACNB e ADAB respectivamente, o que pode ser visto também com a FM na proporção 96:04, porém com a proporção 95:05 é obtido uma melhor separação entre os padrões analíticos ACNB e ADAB.

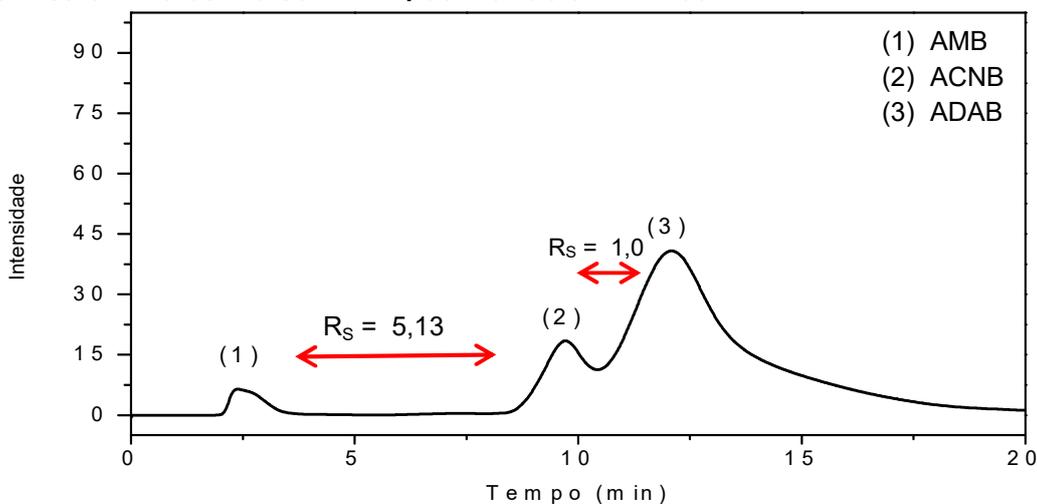
Ao fim da otimização do método cromatográfico, pode-se observar através dos cromatogramas da Figura 28, que o método utilizando os parâmetros temperatura em 35 °C, fluxo em 1 mL min<sup>-1</sup> e FM contendo 95:05 (ACN:H<sub>2</sub>O) apresentou os melhores resultados de separação dos analitos AMB, ACNB e ADAB, onde pode-se observar 3 picos cromatográficos referentes a cada um dos analitos e com melhor resolução em comparação aos demais cromatogramas [Rs (AMB-ACNB) = 0,76 e Rs (ACNB-ADAB) = 1,2].

Na otimização da composição da fase móvel é visto que uma menor concentração de água na fase móvel tende a melhorar a separação entre o AMB e os demais compostos, dessa forma, o uso de um gradiente de eluição pode melhorar a resolução entre os picos cromatográficos.

#### 5.6.4. Avaliação do uso de gradiente

O uso do gradiente de eluição (Tabela 4) fez com que fosse aumentado o tempo de retenção dos compostos na coluna, devido ao início da análise possuir uma menor concentração de água na FM, melhorando a separação dos compostos (Figura 29). Aumentando a resolução, principalmente, entre o AMB e o ACNB.

**Figura 29 - Análise usando gradiente de eluição da mistura dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700.**



FONTE: Autor, 2019.

Com o uso de gradiente foi analisado cada um dos analitos individualmente, para poder avaliar a eficiência da FE na separação desses compostos através de parâmetros como número de pratos teóricos, altura do prato teórico e assimetria de pico (Tabela 11).

**Tabela 11 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700 usando gradiente nas análises dos padrões analíticos. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria**

Compostos Orgânicos	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $As = B / A$
AMB	56,00	0,45	2,05
ACNB	180,00	0,14	1,22
ADAB	128,00	0,19	0,95

FONTE: Autor, 2019.

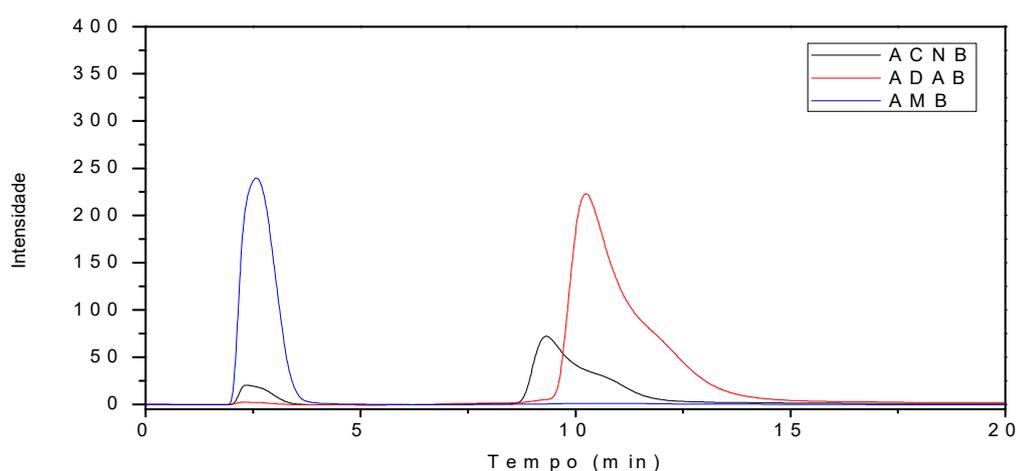
O Uso do gradiente na separação desses três padrões analíticos causou um aumento no número de pratos teóricos para os compostos ACNB e DAB, melhorando inclusive a simetria dos picos, obtendo-se valores dentro do que é considerado aceitável ( $< 1,5$ ), fazendo com que fossem obtidos picos mais

simétricos, ou seja, com caudas menores, o que colabora com o aumento da resolução dos picos.

A melhora na separação dos compostos com o uso de gradiente não foi suficiente para que houvesse a separação completa dos analitos, sendo observada uma coeluição entre o ACNB e o ADAB. Essa coeluição é causada principalmente pela largura apresentada pelos picos do ACNB e do ADAB, visto que os tempos de retenção dos mesmos não são tão próximos ( $t_R = 9,972$  e  $t_R = 13,576$  min respectivamente). Uma das alternativas mais utilizadas em HILIC para a melhora do perfil do pico cromatográfico, ou seja, aumento da simetria e diminuição da largura do pico, é o uso de um ácido ou sal na porção aquosa da FM para aumentar a sua força iônica.

Com o propósito de melhorar o perfil do pico cromatográfico, foi utilizado o ácido tetrafluoracético (TFA) na FM em uma proporção de 0,1% (MCCALLEY, 2017). Foram feitas análises dos três padrões analíticos (Figura 30) usando essa nova FM com os mesmos parâmetros de eluição otimizados com gradiente de FM.

**Figura 30 - Análise individual, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3- mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B700.**



FONTE: Autor, 2019.

Os cromatogramas obtidos utilizando TFA na FM mostraram uma redução da largura dos picos, causando com isso um aumento no número de pratos teóricos

para cada composto (Tabela 12), aumentando, entretanto, a assimetria dos picos referentes aos analitos ACNB e ADAB e diminuindo seus tempos de retenção.

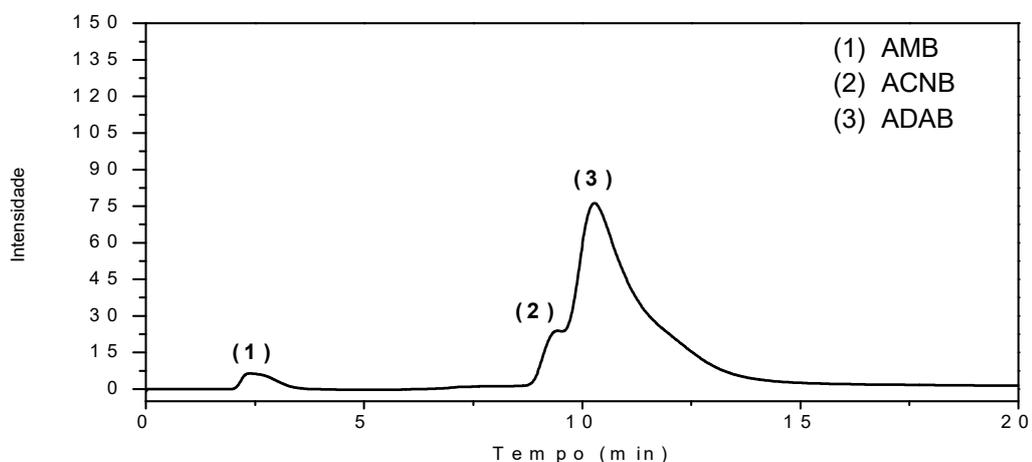
**Tabela 12 - Parâmetros utilizados para a avaliação da eficiência da coluna cromatográfica B700 usando TFA na FM nas análises dos padrões analíticos. Número de pratos teóricos (N), Altura do prato teórico (H) e Assimetria de pico (As). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria**

Compostos Orgânicos	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$
AMB	61,00	0,41	1,31
ACNB	459,00	0,05	2,51
ADAB	411,00	0,06	2,51

FONTE: Autor, 2019.

O aumento no número de pratos teóricos é significativo, entretanto é notado que há um aumento, também significativo na assimetria de pico, devido a formação de cauda nos picos, fazendo que a assimetria dos picos referentes aos compostos químicos ACNB e ADAB aumentasse, contribuindo para que haja uma coeluição dos picos. Para observar melhor como seria afetada a resolução cromatográfica, foi feita a análise da mistura desses analitos com FM com TFA (Figura 31).

**Figura 31 - Análise, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3-mercaptopbenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico (ADAB) utilizando a FE B700.**

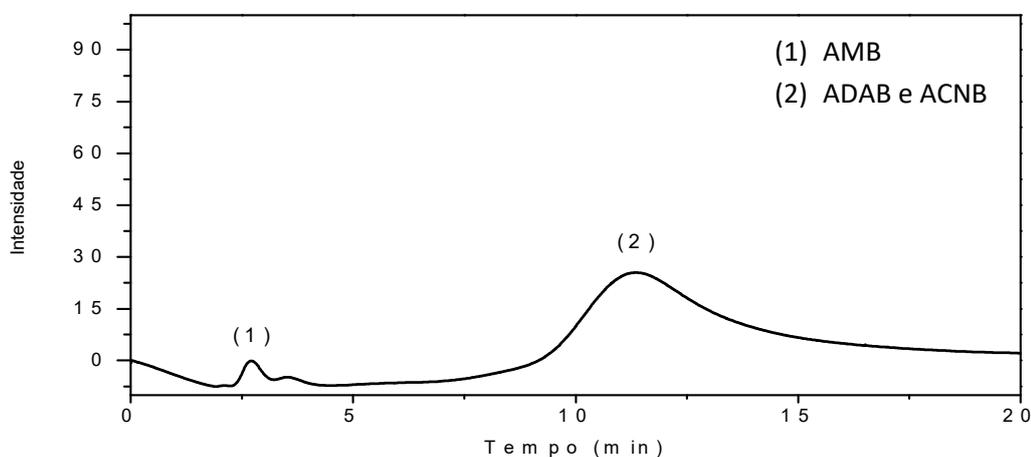


FONTE: Autor, 2019.

Apesar do aumento do Número de pratos teóricos, a redução do tempo de retenção do ADAB, juntamente com a formação de cauda no pico do ACNB, contribuíram para uma maior coeluição dos picos. A análise da mistura dos padrões analíticos usando TFA na FM mostrou que a FM sem TFA se mostrou mais adequada para a separação desses analitos visto que foi obtido um cromatogramas com maior resolução entre os picos. Entretanto, uma otimização no método cromatográfico usando TFA na FM poderá resultar em análises mais eficientes, uma vez que o seu uso na FM contribui para o aumento do número de pratos teóricos.

Com a otimização do método, e a escolha do uso de gradiente sem TFA na FM como melhor método cromatográfico, por mostrar melhor resolução entre os picos, para as análises desses padrões analíticos, foi repetida a análise da mistura desses padrões analíticos usando a FE B350, para avaliar se a presença de matéria orgânica na FE contribuiria ou não na separação dos analitos (Figura 32).

**Figura 32 - Análise, usando TFA na FM, dos padrões analíticos ácido 3-mercaptobenzoico (AMB), ácido 3- cianobenzoico (ACNB) e ácido 3- dimetilamino benzoico ADAB) utilizando a FE B350.**



FONTE: Autor, 2019.

Na análise usando a FE B350, foi observada a presença de apenas 2 picos cromatográficos, mostrando que houve uma coeluição total entre os analitos ACNB e ADAB, devido ao alargamento demasiado dos picos. Dessa forma pode-se perceber que a FE B700 se mostrou mais eficiente nas análises dos padrões analíticos AMB, ACNB e ADAB, visto que mostrou melhor resolução e menor coeluição na separação desses analitos em comparação com FE B350, que apresentou picos

ainda mais largos, mostrando uma interação demasiada com os analitos. Com isso é pode-se dizer que a presença da matéria orgânica presente na FE B350 influenciou de forma negativa na separação cromatográfica, apresentando uma maior coeluição entre os picos.

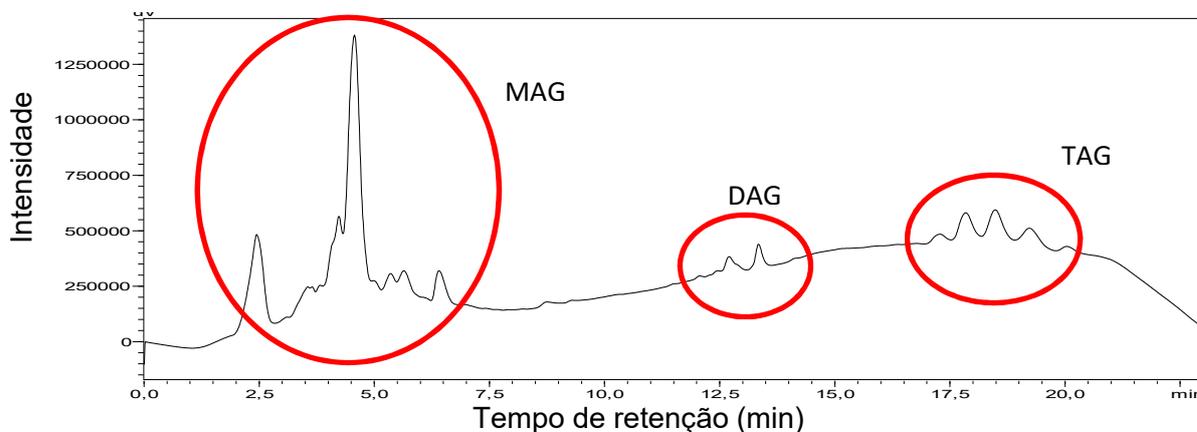
### **5.7. Cromatografia líquida clássica (CLC)**

Na separação granulométrica dos materiais sintetizados nas peneiras de 10, 45, 100 e 150 micrômetros foi observado que a maior fração do material ficou retido na peneira de 45 micrômetros, ou seja, partículas com tamanho entre 45 e 100 micrômetros. Tamanho este considerando grande para uma FE em HPLC, entretanto é uma faixa de tamanho de partícula que pode ser utilizada em CLC, visto que nessa técnica é necessário que as partículas da FE tenham tamanhos maiores que em HPLC, uma vez que apenas a gravidade (ou vácuo se for necessário) será responsável pela passagem da FM através da coluna, diferente de HPLC, onde uma bomba faz pressão, empurrando a FM através da coluna e eluindo os compostos.

Para CLC foi utilizada uma coluna de vidro a qual foi recheada com o material calcinado a 350°C (com as proporções de óxidos em 65% SiO<sub>2</sub>, 29% Li<sub>2</sub>O, 5% BaO e 1% ZrO<sub>2</sub>), visto que esse apresentou a maior área superficial (285 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) dentre os materiais obtidos.

As análises das frações obtidas da CLC foram feitas utilizando o modo RPLC, em uma coluna C18, como descrito na parte experimental (Tabela 5). Antes de ser feita a análise das frações, foi realizada a análise da amostra, por HPLC, antes de ser fracionada pela coluna (Figura 33), para identificar a presença dos analitos na amostra, a quantidade de MAG, DAG e TAG e a faixa de tempo de retenção de cada classe. Com isso foi possível identificar cada uma das classes dos compostos fracionados pela comparação do tempo de retenção dos analitos na amostra e nas frações coletadas.

**Figura 33 - Análise da amostra contendo MAG, DAG e TAG em HPLC.**



FONTE: Autor, 2019.

Através da normalização das áreas dos picos foi feito o cálculo da porcentagem de cada classe de compostos na amostra (Tabela 13), indicando com isso que a maior parte da amostra é composta por MAG, seguido de DAGs e em menor quantidade TAGs.

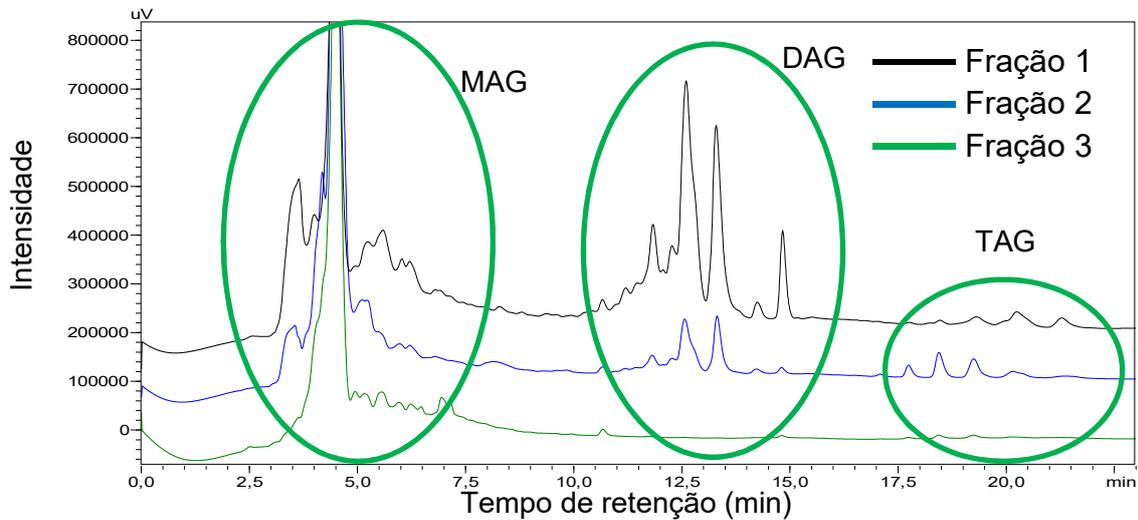
**Tabela 13 - Porcentagens de cada classe de composto contido na amostra inicial.**

	$t_R$ (min)	Área	%
<b>MAG</b>	2,21 – 6,08	58439463	82
<b>DAG</b>	12,72 – 13,50	2207553	3
<b>TAG</b>	16,54 – 20,75	10637157	15

FONTE: Autor, 2019.

Os resultados obtidos para as 3 frações, tolueno (fração 1), tolueno:éter etílico (fração 2) e éter etílico (fração 3), estão representados nos cromatogramas da Figura 34. De acordo com as polaridades dos analitos, era esperado que na primeira fração fossem eluídos apenas os TAG, entretanto o que observa-se é que há a eluição de MAG e DAG, enquanto que os TAGs só são eluídos na fração 2 que deveria conter apenas DAG, porém foram eluídos MAG, DAG e TAG. Já na fração 3 foram eluídos apenas MAG como deveria ocorrer, entretanto a presença de MAG ocorreu em todas as frações coletadas.

**Figura 34 - Análise das frações de CLC usando a FE A350 para separação de MAG, DAG e TAG.**

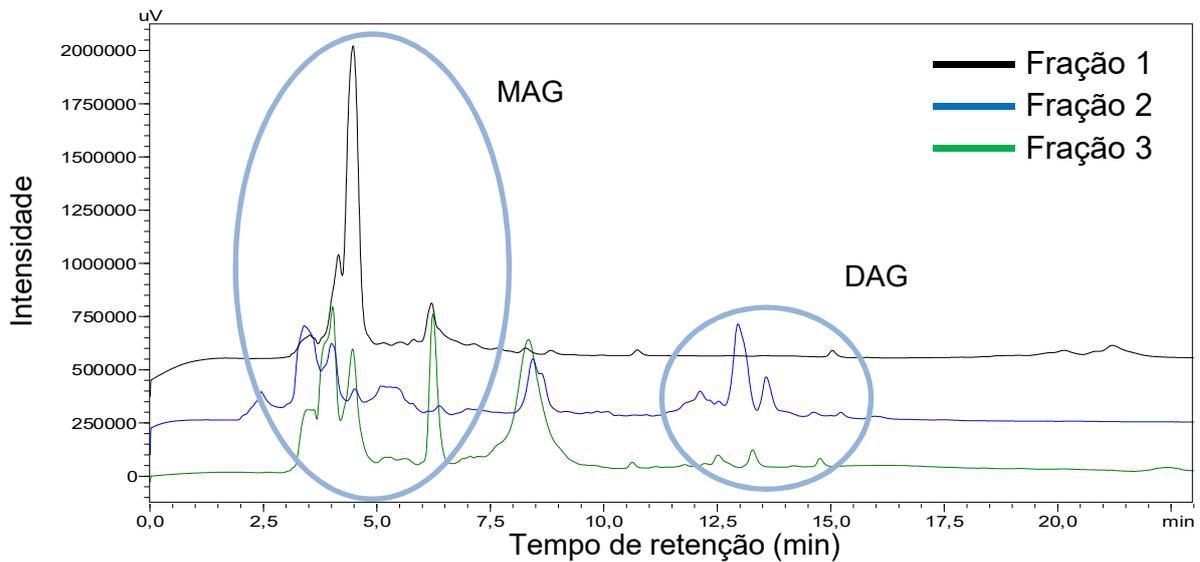


FONTE: Autor, 2019.

O fato de ter MAG em todas as frações pode estar ligado à composição da amostra, que, como mostrado no cromatogramas da Figura 33, é composta por mais de 80% de MAG. Essa alta concentração de MAG na amostra pode ter feito com que ocorresse a saturação dos sítios ativos da FE com MAG, que são os compostos mais polares, interferindo assim na separação dessas classes de compostos.

Para avaliar de fato a eficiência da FE na separação dessas classes de compostos, foram feitas as mesmas análises usando sílica como FE, como está descrito na literatura (Figura 35). A coluna de sílica foi preparada do mesmo modo que a coluna usando a FE A350, e foi usado o mesmo método cromatográfico para a separação dos analitos.

**Figura 35 - Análise das frações de CLC usando sílica como FE para separação de MAG, DAG e TAG.**



FONTE: Autor, 2019.

Com o uso de sílica como FE é visto que há uma melhor separação dos DAG, os quais foram eluídos apenas na fração 2 como era esperado, entretanto os DAG estão presentes na fração 3, saindo em 2 frações diferentes, como ocorreu com a FE A350. Assim como na coluna com a FE A350, na coluna com sílica também não foi possível separar os MAGs, tendo eles sido eluídos em todas as frações coletadas, o que corrobora com a saturação da coluna cromatográfica devido a alta concentração desses compostos. Portanto para se obter resultados mais conclusivos a respeito da eficiência da FE sintetizada em colunas de CLC deverão ser feitos mais testes aumentando a quantidade de FE e ainda utilizando amostras com menor concentração de MAG, ou seja, com concentrações de MAG, DAG e TAG semelhantes.

## 6. CONCLUSÃO

Os óxidos mistos foram sintetizados com êxito através da metodologia de complexação metal-quitosana, como pode ser comprovado através das técnicas de caracterização de DRX e FTIR que mostraram a presença dos óxidos precursores no material obtido.

O planejamento experimental realizado na etapa de calcinação do material mostrou que o único parâmetro, que influenciou na área superficial das amostras foi a temperatura, de forma que quanto menor a temperatura utilizada, maior a área superficial, entretanto há o risco de não ocorrer a total degradação da matéria orgânica contida no material antes da calcinação.

Nos testes cromatográficos (HPLC), foram comparadas as FE calcinadas a 350 °C (A350) e 700 °C (A700) com tamanho de partícula de 45-100 µm e calcinadas a 350 °C 700 °C com tamanho de partícula de 10-45 µm (B350 e B700 respectivamente) e até o momento a FE B700 apresentou resultados interessantes em relação à separação dos compostos derivados do ácido benzoico em comparação com a FE B350, visto que apresentou melhor resolução entre os analitos, conseguindo separar os 3 padrões analisados. Levando em conta que as partículas da FE ainda estão com um tamanho elevado, comparados a uma FE comercial, Isso indica que a FE B700 tem uma boa perspectiva de melhora em seus resultados, já que tanto o método cromatográfico como o tamanho das partículas podem, ainda, ser otimizados.

Os testes realizados por CLC da amostra contendo MAG, DAG e TAG mostrou que a FE não conseguiu separar os compostos como deveria, entretanto quando comparada sílica comercial como FE foram observados resultados semelhantes em relação a eluição dos MAG, mostrando que a alta concentração de MAG na amostra pode ter interferido na separação.

## 7. PERSPECTIVAS

- I. Realizar novos testes cromatográficos com diferentes padrões analíticos.
- II. Realizar a caracterização da FE após os testes cromatográficos
- III. Repetir as análises em CLC com amostras contendo menor teor de MAG;
- IV. Alterar as proporções dos óxidos na FE a fim de se obter uma FE com maior área superficial e mais eficiente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPERT, Andrew J. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 62–76, 2008.

ALPERT, Andrew J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 499, p. 177–196, 1990.

ARAL, Hayriye; ÇELİK, K. Serdar; ALTINDAĞ, Ramazan; *et al.* Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. **Talanta**, v. 174, p. 703–714, 2017.

BAGHERI, Mohsen; TAHERI, Mohammadreza; FARHADPOUR, Mohsen; *et al.* Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for analysis of opium alkaloids. **Journal of Chromatography A**, v. 1511, p. 77–84, 2017.

BARTÓ, Endre; FELINGER, Attila; JANDERA, Pavel. Investigation of the temperature dependence of water adsorption on silica-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1489, p. 143–148, 2017.

BENVENUTTI, Edilson V.; COSTA, Tania M. H.; MORO, Celso C.; *et al.* Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1926–1933, 2009.

BORGES, Endler Marcel; GORAIEB, Karen; COLLINS, Carol H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 993–1003, 2012.

BORÓWKO, Małgorzata; OŚCIK-MENDYK, Barbara. Adsorption model for retention in normal-phase liquid chromatography with ternary mobile phases. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 118, n. 1–3, p. 113–124, 2005.

BRAGA, Tiago Pinheiro *et al*, Synthesis of hybrid mesoporous spheres using the chitosan as template, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 355, n. 14–15, p. 860–866, 2009.

BUSZEWSKI, Bogusław; NOGA, Sylwia. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231–247, 2012.

CAI, Jianfeng; CHENG, Lingping; ZHAO, Jianchao; *et al*. A polyacrylamide-based silica stationary phase for the separation of carbohydrates using alcohols as the weak eluent in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 153–159, 2017.

CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo S. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CLAESSENS, H.A.; VAN STRATEN, M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, n. 1–2, p. 23–41, 2004.

COLLINS, C.H. **Introducao a metodos cromatograficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

DE SOUZA, Michelle Matos; BORTOLUZZI, Janaina Heberle; CARASEK, Eduardo. Thermal Immobilization of Poly(Butylacrylate) on Glass-Ceramic Rod for Preparation of Solid Phase Microextraction Fibers. **Microchimica Acta**, v. 155, n. 3–4, p. 465–469, 2006.

FEKETE, Szabolcs; BECK, Alain; VEUTHEY, Jean-Luc; *et al.* Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 43–55, 2015.

FEKETE, Szabolcs; GASSNER, Anne-Laure; RUDAZ, Serge; *et al.* Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 74–83, 2013.

GAMA, Mariana Roberto; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan. Nanomaterials in Liquid Chromatography: Recent Advances in Stationary Phases. *In*: **Nanomaterials in Chromatography**. [s.l.]: Elsevier, 2018, p. 255–297. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128127926000091>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

GAMA, Mariana Roberto; DA COSTA SILVA, Raquel Gomes; COLLINS, Carol H.; *et al.* Hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 48–60, 2012.

GARCÍA-GÓMEZ, D.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 47, p. 111–128, 2013.

GARGANO, Andrea F.G.; LEEK, Tomas; LINDNER, Wolfgang; *et al.* Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction. **Journal of Chromatography A**, v. 1317, p. 12–21, 2013.

GORAIEB, Karen; BUENO, Maria Izabel M. S.; COLLINS, Carol H.; *et al.* Preparação, caracterização e aplicação de fases estacionárias tipo C8 modificadas por óxidos metálicos para cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1131–1138, 2013.

GORDILLO-DELGADO, F; SOTO-BARRERA, C C; PLAZAS-SALDAÑA, J. Synthesis and characterization of nanometric zinc oxide for a stationary phase in liquid chromatography. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 786, p. 012021, 2017.

GRECO, G.; LETZEL, T. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 7, p. 684–693, 2013.

GUINESI, Luciana Simionatto; ESTEVES, Amanda Alves; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes, Adsorção de íons cobre(II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico, **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007.

GUO, Yong; GAIKI, Sheetal, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 35, p. 5920–5938, 2011.

HAO, Zhigang; XIAO, Baiming; WENG, Naidong. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p. 1449–1464, 2008.

HEATON, James C.; RUSSELL, Joseph J.; UNDERWOOD, Tim; *et al.* Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and simple acid solutions. **Journal of Chromatography A**, v. 1347, p. 39–48, 2014.

HEMSTRÖM, Petrus; IRGUM, Knut. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1784–1821, 2006.

HOU, Yanjie; ZHANG, Feifang; LIU, Xuefang; *et al.* A positively charged porous graphitic carbon stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. **Talanta**, v. 164, p. 159–163, 2017.

JANDERA, Pavel. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1–2, p. 1–25, 2011.

JANDERA, Pavel; HÁJEK, Tomáš; ŠROMOVÁ, Zuzana. Mobile phase effects in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography revisited. **Journal of Chromatography A**, v. 1543, p. 48–57, 2018.

JANDERA, Pavel; JANÁS, Petr. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p. 12–32, 2017.

JANEČKOVÁ, Lucie; KALÍKOVÁ, Květa; BOSÁKOVÁ, Zuzana; *et al.* Study of interaction mechanisms on zirconia-based polystyrene HPLC column. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 19, p. 3043–3051, 2010.

JIANG, Ping; LUCY, Charles A. Retentivity, selectivity and thermodynamic behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons on charge-transfer and hypercrosslinked stationary phases under conditions of normal phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1437, p. 176–182, 2016.

KAISER, Theodore J.; THOMPSON, J. Will; MELLORS, J. Scott; *et al.* Capillary-Based Instrument for the Simultaneous Measurement of Solution Viscosity and Solute Diffusion Coefficient at Pressures up to 2000 bar and Implications for Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 2860–2868, 2009.

KIRKLAND, J.J.; DESTEFANO, J.J. The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1–2, p. 50–57, 2006.

KIRKLAND, J.J.; DILKS, C.H.; DESTEFANO, J.J. Normal-phase high-performance liquid chromatography with highly purified porous silica microspheres. **Journal of Chromatography A**, v. 635, n. 1, p. 19–30, 1993.

KUMAR, Abhinav; HEATON, James C.; MCCALLEY, David V. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1276, p. 33–46, 2013.

LI, Yuanyuan; WEI, Manman; CHEN, Tong; *et al.* Self-assembled cyclodextrin-modified gold nanoparticles on silica beads as stationary phase for chiral liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. **Talanta**, v. 160, p. 72–78, 2016.

LIANG, Tu; FU, Qing; SHEN, Aijin; *et al.* Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 110–118, 2015.

LOGOTHETI, Maria; THEOCHARI, Konstantina; KOSTAKIS, Marios; *et al.* Development and validation of a HILIC-UV method for the determination of nucleotides in fish samples. **Food Chemistry**, v. 248, p. 70–77, 2018.

LUCY, Charles A. Evolution of ion-exchange: from Moses to the Manhattan Project to Modern Times. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 711–724, 2003.

MCCALLEY, David V. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, n. 1–2, p. 85–91, 2008.

MCCALLEY, David V. Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range. **Journal of Chromatography A**, v. 1411, p. 41–49, 2015.

MCCALLEY, David V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1523, p. 49–71, 2017.

MELNIKOV, Sergey M.; HÖLTZEL, Alexandra; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas; *et al.* A Molecular Dynamics View on Hydrophilic Interaction Chromatography with Polar-Bonded Phases: Properties of the Water-Rich Layer at a Silica Surface Modified with Diol-Functionalized Alkyl Chains. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 24, p. 13126–13138, 2016.

MORAIS, Lais S.R.; JARDIM, Isabel C.S.F. Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1–2, p. 127–135, 2005.

NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; *et al.* Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 1, p. 1–30, 2004.

NAWROCKI, J.; RIGNEY, M.; MCCORMICK, A.; *et al.* Chemistry of zirconia and its use in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 657, n. 2, p. 229–282, 1993.

NAZARIO, Carlos Eduardo Domingues; LANÇAS, Fernando Mauro. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 111–135, 2013.

ORO, Nicole E.; LUCY, Charles A. Analysis of the Nitrogen Content of Distillate Cut Gas Oils and Treated Heavy Gas Oils Using Normal Phase HPLC, Fraction Collection and Petroleomic FT-ICR MS Data. **Energy & Fuels**, v. 27, n. 1, p. 35–45, 2013.

ORO, Nicole E.; LUCY, Charles A. High performance liquid chromatographic separations of gas oil samples and their hydrotreated products using commercial normal phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 43, p. 7788–7795, 2011.

PACHECO, Sidney; BORGUINI, Renata G.; SANTIAGO, Manuela Cristina P. A.; *et al.* History of Liquid Chromatography. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.

PESEK, Joseph J.; MATYSKA, Maria T.; BOYSEN, Reinhard I.; *et al.* Aqueous normal-phase chromatography using silica-hydride-based stationary phases. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 64–73, 2013.

PRACHE, Nolwenn; ABREU, Sonia; SASSIAT, Patrick; *et al.* Alternative solvents for improving the greenness of normal phase liquid chromatography of lipid classes. **Journal of Chromatography A**, v. 1464, p. 55–63, 2016.

QIAO, Lizhen; LV, Wangjie; CHANG, Mengmeng; *et al.* Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 141–148, 2018.

QIAO, Lizhen; SHI, Xianzhe; XU, Guowang. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 81, p. 23–33, 2016.

RATHNASEKARA, Renuka; EL RASSI, Ziad. Polar silica-based stationary phases. Part II- Neutral silica stationary phases with surface bound maltose and sorbitol for hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1508, p. 24–32, 2017.

REA, Jennifer C.; MORENO, G. Tony; LOU, Yun; *et al.* Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 317–323, 2011.

SALGADO, Bruno César B.; VALENTINI, Antoninho, Synthesis and Photocatalytic Performance of Macroporous Spheres of Silica Coated with Titanium Dioxide, **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2291–2310, 2015.

SENTKOWSKA, Aleksandra; PYRZYNSKA, Krystyna. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the speciation analysis of selenium. **Journal of Chromatography B**, v. 1074–1075, p. 8–15, 2018.

SILVA, Cesar R.; AIROLDI, Claudio; COLLINS, Kenneth E.; *et al.* Preparation and characterization of a new C18 urea phase based on titanized silica. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, n. 1–2, p. 29–37, 2005.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H. Hydrophilic interaction chromatography (hilic): state of the art and applications. **Química Nova**, 2016.

SILVEIRA, C. B. **Obtenção, caracterização físico química de vidros e vitro-cerâmicos baseados no sistema  $\text{LiO}_2\text{-ZrO}_2\text{-BaO-SiO}_2$** . 2001, 76 f. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Principles of instrumental analysis**. 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.

SONG, Huiying; VANDERHEYDEN, Yoachim; ADAMS, Erwin; *et al.* Extensive database of liquid phase diffusion coefficients of some frequently used test molecules in reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1455, p. 102–112, 2016.

SUTTON, Paul A.; NESTERENKO, Pavel N. Retention characteristics of aromatic hydrocarbons on silica and aminopropyl-modified monolithic columns in normal-phase HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 17, p. 2900–2909, 2007.

TARAJI, Maryam; HADDAD, Paul R.; AMOS, Ruth I.J.; *et al.* Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1000, p. 20–40, 2018.

THOMPSON, J. Will; KAISER, Theodore J.; JORGENSON, James W. Viscosity measurements of methanol–water and acetonitrile–water mixtures at pressures up to 3500bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1–2, p. 201–209, 2006.

VARMA, A.J; DESHPANDE, S.V; KENNEDY, J.F, Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 77–93, 2004.

VIEIRA, R.S; BEPPU, M.M. Complexação de íons cobre e mercúrio em quitosana natural e modificada quimicamente. **Anais do 8º congresso brasileiro de polímeros**. P. 366-367, 2005.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika; PETRUCZYNIK, Anna; HAWRYŁ, Anna. Comparison of chromatographic properties of cyanopropyl-, diol- and aminopropyl-

polar-bonded stationary phases by the retention of model compounds in normal-phase liquid chromatography systems. **Journal of Chromatography A**, v. 919, n. 1, p. 39–50, 2001.

WANG, Qing; LI, Jing; YANG, Xin; *et al.* Investigation on performance of zirconia and magnesia–zirconia stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. **Talanta**, v. 129, p. 438–447, 2014.

WATANABE, Yasushi. Assessment study of ion-exchange chromatography combined with solution X-ray scattering measurement for protein characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1539, p. 103–107, 2018.

WU, Di; LUCY, Charles A. Study of the slope of the linear relationship between retention and mobile phase composition (Snyder-Soczewiński model) in normal phase liquid chromatography with bonded and charge-transfer phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1475, p. 31–40, 2016.

XIONG, Caifeng; YUAN, Jie; WANG, Zhiying; *et al.* Preparation and evaluation of a hydrophilic interaction and cation-exchange chromatography stationary phase modified with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. **Journal of Chromatography A**, v. 1546, p. 56–65, 2018.

ZHAI, Xingchen; ZHAO, Haitian; ZHANG, Min; *et al.* New stationary phase for hydrophilic interaction chromatography to separate chito-oligosaccharides with degree of polymerization 2-6. **Journal of Chromatography B**, v. 1081–1082, p. 33–40, 2018.

ZHANG, Yujie; LI, Qiaoqi; DAI, Benlin; *et al.* A versatile polar-embedded polyphenyl phase for multimodal separation in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1553, p. 81–89, 2018.