

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

**Desenvolvimento de Colunas Monolíticas Poliméricas
para Extração em Fase Sólida de Metais e Separação
de Neurotransmissores por Nanocromatografia de
Interação Hidrofílica**

Versão corrigida da tese defendida.

A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/09/2018

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

**Desenvolvimento de Colunas Monolíticas Poliméricas
para Extração em Fase Sólida de Metais e Separação
de Neurotransmissores por Nanocromatografia de
Interação Hidrofílica**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências - Área: Química*

Orientador: Jorge Cesar Masini

São Paulo

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Jorge pela excelente orientação durante o mestrado e doutorado, pela grande qualidade dos ensinamentos e pela amizade e incentivo.

Aos docentes do Instituto de Química que ministraram disciplinas importantes na formação.

Aos colegas de laboratório pela amizade e cooperação.

Aos funcionários do IQ, da SPG e da Universidade de São Paulo.

Ao Professor Jirí Urban, da Faculdade Masarykova na República Tcheca, que aceitou me receber num estágio de curta duração e me apresentou à sua linha de pesquisa, sem nenhum benefício além de criar uma cooperação científica.

À agência de fomento CNPq pela concessão da bolsa de doutorado (processo 161769/2014-4).

A todos os amigos e professores que eu encontrei na vida acadêmica. Obrigado pela experiência de fazer parte de atividades de pesquisa.

RESUMO

(Ribeiro, L.F.) **Desenvolvimento de Colunas Monolíticas Poliméricas para Extração em Fase Sólida de Metais e Separação de Neurotransmissores por Nanocromatografia de Interação Hidrofílica**. 2018. 164p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesse trabalho de duas partes, colunas monolíticas poliméricas foram aplicadas em extração em fase sólida e em nanocromatografia capilar, duas das suas mais importantes aplicações. Na primeira parte foi desenvolvido um monolito para extração em fase sólida dos metais Cd(II), Pb(II) e Cu(II), que foi acoplada on-line com detecção eletroquímica com o auxílio de instrumentação de análise por injeção sequencial (SIA). A coluna usada como suporte sólido para extração em fase sólida foi obtida com a copolimerização entre formador de ligação cruzada etileno dimetacrilato (EDMA) e monômero funcional glicidil metacrilato (GMA), preparada a partir de uma mistura reacional composta de 30% GMA, 10% EDMA, 5% H₂O, 35% n-propanol e 20% 1,4- butanodiol, aquecida durante 24 horas à 60°C. Essa composição e condições de polimerização favoreceram a permeabilidade do monolito, o que foi necessário para o acoplamento no SIA. Após a obtenção do monolito base o mesmo foi modificado pela reação do anel epóxi do grupo GMA com ácido iminodiacético (IDA) para garantir propriedades de quelação de metais e maior capacidade de adsorção para a coluna. O monolito foi caracterizado com imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) e a capacidade de extração foi de $4,4 \pm 0,3$ mg Cu(II) m⁻¹ obtida com curvas de breakthrough. O método de determinação on-line dos metais operado por SIA, que executou as etapas de carregamento de amostra, limpeza da coluna, eluição dos analitos e recondicionamento dos sítios ativos teve frequência amostral de 6,8 injeções por hora. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método foram, respectivamente, de 1,0 e 3,3 µg L⁻¹ para o Cd(II), 0,7 e 2,2 µg L⁻¹ para o Pb(II) e 0,5 e 1,8 µg L⁻¹ para o Cu(II). O método foi aplicado na determinação dos metais em diferentes matrizes de águas naturais, sendo encontrado Cu(II) em algumas amostras. A exatidão do método foi avaliada com estudos de adição e recuperação nessas águas, obtendo-se valores entre 75,5 e 116,6%. Na segunda parte do trabalho foi utilizada uma coluna polar composta da sulfobetaina zwitteriônica N,N-dimetil-N-metacrilatoil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA) e do formador de ligações cruzadas dioxietil dimetacrilato (DiEDMA) em Nanocromatografia de Interação Hidrofílica (HILIC) para fazer a separação de Dopamina, Epinefrina, Norepinefrina, L-DOPA, Tiramina, DOPAC e Ácido Homovanílico, neurotransmissores, alguns de seus metabólitos e precursores, compostos polares de baixa massa molecular. A seletividade cromatográfica da coluna foi altamente dependente da composição da fase móvel aquosa:orgânica, apresentando um mínimo de retenção na transição do mecanismo HILIC para a fase reversa (RP). Ajustando os dados experimentais de fatores de retenção em função da composição da fase móvel com o modelo de retenção duplo foi possível prever qual composição de fase móvel promoveria a separação dos analitos da mistura, que foi atingida em torno de 85% acetonitrila e 15% H₂O. A coluna foi modificada com o grupo zwitteriônico 2-metacrilatoil-oxietil fosforilcolina (MPC) por UV grafting e a modificação da metade do comprimento da coluna durante 30 minutos de exposição UV levou às mudanças na seletividade cromatográfica.

Palavras-chave: Monolitos porosos poliméricos, Extração em Fase Sólida on-line, Nanocromatografia HILIC, Metais, Neurotransmissores

ABSTRACT

(Ribeiro, L.F.) **Development of Polymeric Monolithic Columns for Solid Phase Extraction of Metals and Separation of Neurotransmitters by Hydrophilic Interaction.** 2018. 164p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this two parts work, polymeric monolithic columns were applied in solid phase extraction and in capillary nanochromatography, two of their most important applications. In the first part, a monolith for solid phase extraction of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) metals was developed and coupled online with electrochemical detection with the aid of sequential injection analysis instrumentation (SIA). The column used as a solid support for solid phase extraction was obtained by copolymerization between the crosslinker ethylene dimethacrylate (EDMA) and the functional monomer glycidyl methacrylate (GMA), prepared from a reaction mixture composed of 30% GMA, 10% EDMA, 5% H₂O, 35% n-propanol and 20% 1,4-butanediol, heated at 60 ° C for 24 hours. This composition and polymerization conditions favored monolith's permeability, which was required for the SIA coupling. After obtaining the base monolith, it was modified by reaction of the epoxy ring of the GMA group with the iminodiacetic acid (IDA) to guarantee metals chelating properties and increase adsorption capacity for the column. The monolith was characterized by scanning electron microscopy (SEM) images and extraction capacity was 4.4 ± 0.3 mg Cu(II) m⁻¹, obtained from breakthrough curves. The method for online determination of metals operated by SIA, which performed the steps of sample loading, column cleaning, analyte elution and reconditioning of active sites had a sampling throughput of 6.8 injections per hour. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) for the method were, respectively, 1.0 and 3.3 µg L⁻¹ for Cd(II), 0.7 and 2.2 µg L⁻¹ for the Pb(II) and 0.5 and 1.8 µg L⁻¹ for Cu(II). The method was applied for the determination of metals in different natural water matrices, finding Cu(II) in some samples. The accuracy of the method was evaluated with addition and recovery studies in these waters, finding recoveries between 75.5 and 116.6%. In the second part of the work, a polar column composed of the zwitterionic sulfobetaine N,N-dimethyl-N-methacryloyloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium betaine (MEDSA) and the cross-linker dioxethyl dimethacrylate (DiEDMA) was used in Hydrophilic Interaction Nanochromatography (HILIC) to separate Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine, L-DOPA, Tyramine, DOPAC and Homovanilic Acid, neurotransmitters, some of its metabolites and precursors, which are polar compounds of low molecular mass. The chromatographic selectivity of the column was highly dependent on the composition of the aqueous:organic mobile phase, showing a minimum retention at the transition from the HILIC to the reverse phase (RP) mechanism. By adjusting the experimental data of retention factors as a function of mobile phase composition with the double retention model it was possible to predict which mobile phase composition would promote the separation of the mixed analytes, which was achieved around 85% acetonitrile and 15% H₂O. The column was modified with the 2-methacryloyl oxyethyl phosphorylcholine (MPC) zwitterionic group by UV grafting and the modification of half column's length during 30 minutes of UV exposure led to changes in the chromatographic selectivity.

Keywords: Polymeric porous monoliths, On-line Solid Phase Extraction, HILIC Nanochromatography, Metals, Neurotransmitters

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	MEDSA N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína
HILIC Cromatografia de Interação Hidrofílica	MPC 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina
HIC Cromatografia de Interação Hidrofóbica	MPTS [3-(metacrilóiloxi)-propil] trimetoxissilano
RPLC Cromatografia Líquida de Fase Reversa	BIGMDA Bisfenol A Glicerolato Dimetacrilato
UPLC Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	DiEDMA dioxietileno dimetacrilato
CLC Cromatografia Líquida Capilar	HEMA 2 – hidroxietil metacrilato
Nano-LC Nanocromatografia Líquida	BMA butil metacrilato
SIC Cromatografia por Injeção Sequencial	AIBN 2,2 azoisobisbutironitrila
CEC Eletrocromatografia Capilar	CIM <i>Convective Interaction Media</i>
CE Eletroforese Capilar	MIP <i>Molecularly imprinted polymers</i>
SPE Extração em Fase Sólida	PEEK Polieter eter cetona
ESI Ionização por Eletrospray	UV Ultravioleta
MS Espectrometria de Massas	LD limite de detecção
FIA Análise por Injeção em Fluxo	LQ limite de quantificação
SIA Análise por Injeção Sequencial	CMP concentração máxima permitida
BI Bead Injection	d.i. diâmetro interno
LOV <i>Lab-on-Valve</i>	m/m proporção massa/massa
SPS Solid Phase Spectroscopy	m/v proporção massa/volume
ASV Voltametria de Redissolução Anódica	DPR Desvio padrão relativo
SCP Cronopotenciometria de Redissolução	TFA Ácido trifluoroacético
MEV Microscopia de Varredura Eletrônica	BP benzofenona
IDA Ácido iminodiacético	R Resolução cromatográfica
EDA etileno diamina	N Eficiência cromatográfica
MES ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico	k fator de retenção
GMA glicidil metacrilato	t _r tempo de retenção
EDMA etileno dimetacrilato	

Sumário

1. CAPÍTULO 1: COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS: ORIGEM, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES..... 11

1.1. Introdução.....	11
1.2. Colunas Monolíticas.....	18
1.3. Separação de moléculas pequenas utilizando monolitos poliméricos.....	27
1.4. Estratégias para aumentar a área superficial de monolitos poliméricos.....	29
1.4.1. Solventes Porogênicos.....	29
1.4.2. Monômeros.....	30
1.4.3. Temperatura.....	32
1.4.4. Tempo de polimerização.....	33
1.4.5. Modificações pós-polimerização e UV grafting.....	33
1.5. Aplicações menos comuns de monolitos poliméricos.....	37
1.5.1. Extração em Fase Sólida.....	37
1.5.2. Hifenação.....	41
1.5.3. Aplicações em dispositivos de microanálise.....	42

2. CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE METAIS UTILIZANDO COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS COMPLEXANTES ASSISTIDA POR ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA.....44

2.1. INTRODUÇÃO.....	44
2.1.1. Poluição de metais.....	44
2.1.2. Preparo de amostras e extração em fase sólida (SPE).....	47
2.1.3. Sorventes usados em SPE.....	49
2.1.4. SPE realizada com monolitos.....	50
2.1.5. Acoplamentos da SPE com métodos de análise em fluxo.....	54
2.1.6. Detecção de metais por métodos eletroquímicos.....	63
2.1.7. Sensores Impressos.....	67
2.2. OBJETIVOS.....	69
2.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	70
2.3.1. Reagentes e Soluções.....	70
2.3.2. Equipamentos.....	70
2.3.3. Procedimentos.....	73
2.3.3.1. Ativação da parede interna da coluna.....	73
2.3.3.2. Síntese de poli (GMA-co-EDMA)-IDA.....	73
2.3.3.3. Procedimento de SPE assistida por análise por injeção sequencial (SIA-SPE) para detecção eletroquímica.....	75
2.3.4. Amostras.....	76
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
2.4.1. Composição do monolito poli (GMA-co-EDMA).....	77
2.4.2. Caracterização por Microscopia por Varredura Eletrônica.....	79
2.4.3. Estudos de adsorção e eluição.....	80
2.4.3.1. Estudos Iniciais.....	80
2.4.3.2. Capacidade de adsorção.....	83

2.4.4. Desenvolvimento de método.....	88
2.4.4.1. Volume de amostra.....	88
2.4.4.2. Volume, concentração e composição do eluente.....	89
2.4.5. Figuras de mérito.....	91
2.4.6. Interferentes.....	94
2.4.7. Determinação simultânea de Cd ²⁺ , Pb ²⁺ e Cu ²⁺	96
2.4.8. Aplicações.....	99
2.5. CONCLUSÃO.....	104
3. CAPÍTULO 3: SEPARAÇÃO DE PRECURSORES E METABÓLITOS DA DOPAMINA POR NANOCROMATOLOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA UTILIZANDO COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS MODIFICADAS COM GRUPO FUNCIONAL POR UV GRAFTING.....	105
3.1. INTRODUÇÃO.....	105
3.1.1. Análise de Neurotransmissores.....	105
3.1.2. Separações cromatográficas de compostos polares.....	108
3.1.3. Seletividade em cromatografia HILIC.....	111
3.1.4. Cromatografia HILIC com monolitos poliméricos.....	116
3.1.5. Sistemas miniaturizados de cromatografia.....	119
3.2. OBJETIVOS.....	122
3.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	123
3.3.1. Materiais.....	123
3.3.2. Preparo de colunas capilares monolíticas de polimetacrilato.....	123
3.3.3. Modificação por UV grafting.....	124
3.3.4. Instrumentação.....	125
3.3.5. Métodos.....	125
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
3.4.1. Desenvolvimento de coluna monolítica polimérica zwitteriônica....	127
3.4.2. Aplicação da coluna poli (MEDSA-co-DiEDMA) na separação de neurotransmissores, seus metabólitos e precursores.....	131
3.5. CONCLUSÃO.....	150
4. CONCLUSÃO GERAL.....	151
5. REFERÊNCIAS.....	152
6. APÊNDICE.....	164

CAPÍTULO 1: COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS: ORIGEM, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos de separação têm sido empregados durante quase toda história da humanidade. Atividades como remoção de contaminantes por filtração em areias ou de excesso de sal por contato com certas folhas encontram-se descritos em trabalhos gregos e egípcios antigos [1]. A simples separação manual de partículas visualmente diferentes (catação) pode ser considerada como um método de separação que utiliza a mão e o olho como instrumentos. Outros métodos de separação como destilação, extração por solvente e amalgamação foram as primeiras técnicas laboratoriais empregadas pelos primeiros químicos. Também podem ser citadas peneiração, ventilação (separação por corrente de ar de um componente da mistura que seja leve), levigação (arraste de sólidos de pouca densidade por corrente de água permanecendo sólidos de maior densidade), flotação, filtração, decantação, separação magnética, centrifugação e evaporação. Cada método de separação utiliza arranjo instrumental para separar os componentes de uma mistura segundo uma propriedade que os diferenciem. Com o progresso da sociedade novos problemas desafiaram a ciência e métodos de separação mais apurados tiveram de ser desenvolvidos para separar componentes com propriedades físico-químicas cada vez mais parecidas, como por exemplo a separação de proteínas do sangue numa análise clínica. Com isso, em misturas complexas as separações mais grosseiras podem continuar a ser feitas por propriedades macroscópicas da matéria, como ponto de fusão, ponto de ebulição e solubilidade, mas as separações de maior interesse frequentemente vão exigir fracionamento mediante uma propriedade de nível molecular, como polaridade, forças de Van der Waals, capacidade de formar ligação de hidrogênio,

presença de íons, capacidade de formar quelato, tamanho molecular ou afinidade por grupo funcional.

Cromatografia líquida é o método de separação em que um suporte sólido (fase estacionária) capaz de reter diferencialmente dois ou mais solutos está disposto em formato de coluna, e um solvente líquido (fase móvel) que contém os solutos é impulsionado através dela, sendo retirados os componentes no final da coluna em tempos diferentes. Em outras palavras, solutos com maior atração pelos sítios ativos do material sólido vão interagir mais fortemente com esses sítios, requerendo maior volume de líquido para serem deslocados, demorando, assim, mais a sair da coluna, enquanto solutos com menor atração vão interagir menos intensamente e serão deslocados mais facilmente pelo líquido e sair antes, por isso nessa técnica a separação ocorre em função do tempo, pela mobilidade dos analitos na coluna. Na cromatografia líquida a separação final se dá por um conjunto de interações dos analitos, tanto com a fase estacionária como com a fase móvel. Desde o primeiro relato escrito no começo do século passado, a técnica recebeu grandes melhorias, passando a ser chamada de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, de *high pressure liquid chromatography* em inglês) para diferenciar das primeiras separações cromatográficas [1, 2], mas o centro da técnica, que rege a separação, ainda é a coluna. Variados tipos de cromatografias líquidas já foram desenvolvidas, nomeadas de acordo com os diferentes mecanismos de separação das colunas, como cromatografia de fase normal (interação polar), cromatografia de fase reversa (interação apolar), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de troca iônica, cromatografia micelar. Grande parte dos esforços em cromatografia sempre estiveram voltados em obter colunas

recheadas de novos materiais, com propriedades morfológicas e superfícies químicas favoráveis para a análise.

Tradicionalmente o material mais utilizado para preenchimento de colunas de separação em HPLC é a sílica funcionalizada com algum agente químico. A utilização da sílica é devido à alta pureza, alta área superficial, reduzido tamanho das partículas (de 5 a 10 μm) além de relativa uniformidade na forma e tamanho das mesmas [2]. O bom desempenho cromatográfico ao usar partículas pequenas e uniformes se explica pela menor variação do tamanho dos possíveis caminhos que a molécula pode percorrer no suporte, tornando a difusão mais uniforme, o que contribui para um menor alargamento de banda relacionado ao composto. Na Figura 1 é mostrado como o tamanho de partícula pode influenciar na difusão por caminhos múltiplos. Sob uma vazão constante, duas moléculas do mesmo composto tendem a seguir caminhos diferentes durante a corrida, e no suporte composto de partículas pequenas ela tem menos desvio do caminho direto, o que contribui para picos mais finos e maior eficiência de separação.

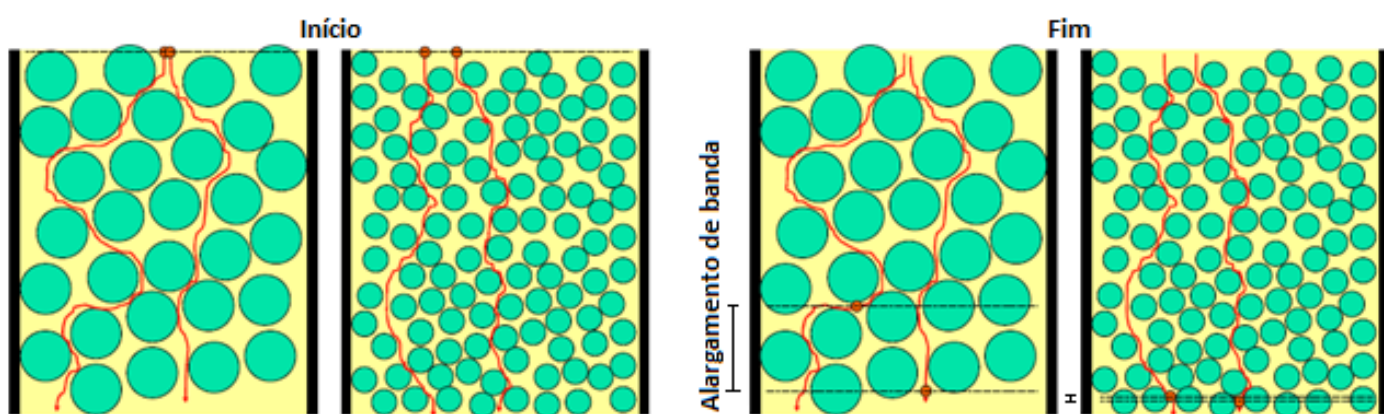


Figura 1: Representação da influência do tamanho da partícula no espalhamento de banda (Fonte: Material de aula do Professor Claudimir Lucio do Lago)

A equação de Van Deemter (Equação 1), bastante difundida no estudo de cromatografia, relaciona altura de prato (H) com velocidade linear do fluxo (μ) e considera que o alargamento de banda ocorre por três fatores, equacionados através de três coeficientes cumulativos que contribuem para o aumento da altura de prato (quanto maior a altura de prato menos eficiente, pois menos etapas de particionamento de analito entre as fases móvel e estacionária pode haver no comprimento da coluna). O termo descrito acima é o termo A chamado de coeficiente de difusão turbilhonar, que é uma constante e não depende da velocidade da fase móvel, somente das propriedades morfológicas que influenciam na difusão da molécula por caminhos preferenciais. Usando-se partículas pequenas esse termo permanece mais baixo, contribuindo menos para o aumento da altura de prato. Outra maneira de diminuir esse tipo de difusão é diminuir o diâmetro interno das colunas cromatográficas, o que diminui a camada de difusão entre fase móvel e fase estacionária, estratégia que foi a origem da Cromatografia Líquida Capilar (CLC, *capillary liquid chromatography*). O termo B é o coeficiente de difusão longitudinal, relacionado à diluição da banda do analito na fase móvel, e tem maior contribuição quanto maior for o tempo da corrida (ou menor o valor da vazão). O termo C é o coeficiente de transferência de massa, que se divide em coeficiente de transferência de massa para a fase estacionária (C_E) e coeficiente de transferência de massa para a fase móvel (C_M). O termo C é relacionado ao alargamento de banda pela dificuldade de estabelecer equilíbrio do analito entre fase móvel e fase estacionária. Ele tem maior contribuição quanto maior for a velocidade linear de fluxo, já que o equilíbrio entre fase estacionária e fase móvel não se torna mais rápido na mesma proporção que o aumento do fluxo. Esse termo depende intimamente da porosidade da fase estacionária e do tamanho da partícula, pois é necessário o movimento do soluto através da fase móvel estagnada nos poros até alcançar a

superfície da fase estacionária, onde as interações irão ocorrer [3]. Para uma transferência de fase rápida e menor contribuição desse termo, o uso de partículas pequenas também é aconselhável, pois quanto menores as partículas, menos profundos são os poros, e assim menor variação na profundidade de difusão dos analitos nos poros do material (C_E). A variação do caminho da fase móvel também é menor com partículas pequenas (C_M). Dessa forma obtém-se a equação de Van Deemter [123]:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C_E \cdot \mu + C_M \cdot \mu \quad (1)$$

A equação explica a observação empírica de que existe uma velocidade linear de fluxo ótima (onde se encontram as contribuições dos termos B e C), que diminui a altura de prato ao valor mínimo. Acima dessa velocidade há um aumento na dispersão, ocasionado pelo termo C (Figura 2). Usando partículas pequenas há uma menor correlação entre aumento de altura de prato com aumento da velocidade (termo C), e menor difusão por turbilhonamento (termo A), por isso na evolução da cromatografia partículas pequenas foram o tipo de suporte escolhido.

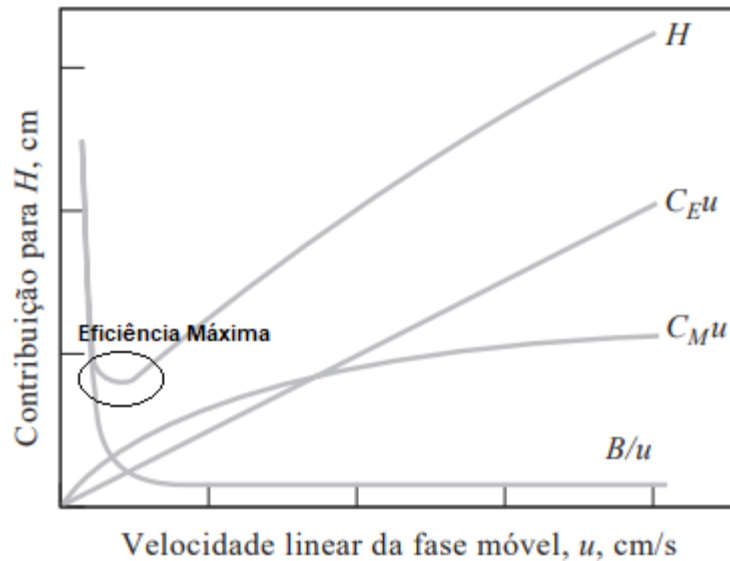


Figura 2: Gráfico de Van Deemter e contribuição de cada termo para altura de prato [adaptado da referência 123]

Ao se trabalhar com partículas muito pequenas ($> 2 \mu\text{m}$), um preço inevitável é o aumento da resistência à passagem de fase móvel pela coluna: quanto menor a partícula maior o empacotamento e maior o volume de fase móvel que está sem mobilidade nos poros onde ocorre a transferência de massa. Por isso quanto menor a partícula maior a pressão necessária para impulsionar o líquido pela coluna numa vazão trabalhável, que não aumente grandemente a contribuição do termo B da equação de Van Deemter. Na prática há um compromisso entre eficiência da separação e permeabilidade do suporte (consequentemente vazão máxima de trabalho e tempo da corrida).

Um problema na evolução desse tipo de coluna surgiu quando, na busca por eficiência, o tamanho das partículas diminuiu para a faixa de 1 a $3 \mu\text{m}$, tornando a pressão necessária para fornecer fluxo alta demais para a instrumentação comum em HPLC. Colunas com partículas de $1,7 \mu\text{m}$ podem garantir uma altíssima eficiência, mas são acopladas quase que exclusivamente em sistemas de UPLC (*Ultrapressure Liquid Chromatography*), que são cromatógrafos muito mais caros, com bombas que fornecem

pressão de até 5000 bar, uma ordem de grandeza acima das bombas em HPLC [4,5].

Alternativamente aos sistemas de UPLC, ao longo da primeira década do século XXI as colunas empacotadas com partículas core-shell passaram a ser exploradas comercialmente. Tais partículas apresentam um núcleo impenetrável de sílica fundida variando de 1,3 a 5 μm recoberto por uma camada externa porosa de sílica gel com espessura entre 0,23 e 0,50 μm , de modo que os tamanhos dos caminhos difusivos são muito menores do que nas partículas totalmente porosas. A morfologia dessas partículas permite a construção de colunas cromatográficas que podem ser usadas por sistemas de HPLC convencionais, ou seja, com pressões de até 400 bar. Métodos analíticos baseados em colunas preenchidas com partículas totalmente porosas usadas em UPLC ou em colunas preenchidas com a partículas core-shell envolvem separações mais rápidas e consomem menos solventes do que métodos baseados em colunas tradicionais, preenchidas com partículas totalmente porosas com diâmetro variando entre 3,5 e 5,0 μm . Um terceiro tipo de fase estacionária é a das chamadas colunas monolíticas, as quais já existiam desde a década de 1970, tendo seu conceito sido apresentado alguns anos antes, sendo idealizadas como meio contínuos de separação numa estrutura de gel porosa [6]. Apesar de existirem há algum tempo, somente a partir de 1992 fases estacionárias monolíticas começaram a ganhar popularidade, tendo seu desenvolvimento impulsionado com surgimento da proteômica [7] e da necessidade de separação de macromoléculas em pesquisa bioquímica.

1.2. Colunas Monolíticas

Colunas monolíticas são meios contínuos de separação, que ao contrário de serem compostos de várias partículas, podem ser considerados uma grande partícula que preenche completamente o volume e o formato de uma coluna de separação. A principal característica desse meio de separação é a presença de macroporos (poros com diâmetro superior a 50 nm, de acordo com a IUPAC [5]) interconectados denominados de poros de fluxo (ou “*flow-through pores*” em inglês), longos canais internos ao longo da estrutura do monolito que garantem uma alta porosidade externa e oferecem pouca resistência à vazão da fase móvel, resultando em baixas pressões com o fornecimento do fluxo. Os poros de fluxo conectam os poros menores (mesoporos, de tamanho entre 2 e 50 nm de acordo com a IUPAC [5]) que são responsáveis pela retenção e seletividade da separação. Então, comparando as colunas monolíticas com colunas de materiais particulados, o transporte de massa ocorre por convecção, além de difusão. Este tipo de fluxo só ocorre em poros bastante largos e permite uma maior rapidez na transferência de massa, o que eleva a eficiência a valores similares à de colunas preenchidas com material particulado da ordem de 3,5 µm de diâmetro, mas com pressões reduzidas [8]. Apesar das colunas particuladas terem maior quantidade de material por volume devido ao empacotamento, o aproveitamento do volume de uma coluna de material particulado não é melhor do que uma coluna monolítica, já que grande parte do volume da fase estacionária é ocupado por fase móvel estagnada nos poros, enquanto que em colunas monolíticas os poros são mais acessíveis e toda a fase móvel passa pelos poros do monolito. Svec comenta que de maneira simplificada, em colunas monolíticas os analitos são levados ao ponto de interação por fluxo (convecção) e não por difusão [6]. A Figura 3 contém imagem da estrutura de um monolito de sílica e imagens detalhadas

da estrutura de mesoporos e macroporos obtidos por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV).

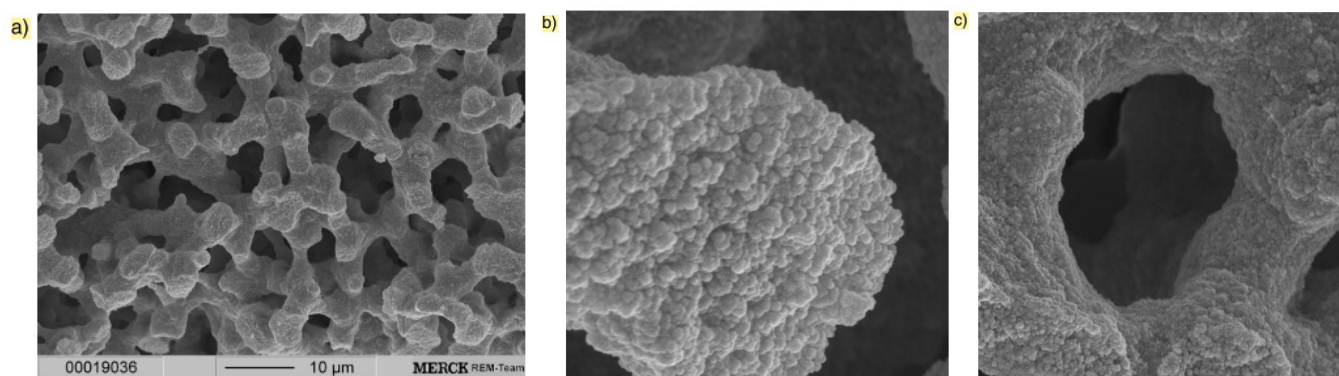


Figura 3: (a) Imagem de MEV da estrutura de um típico monolito de sílica; (b) detalhe da estrutura mesoporosa do esqueleto de sílica; (c) poros de fluxo (adaptado da referência 13)

Em termos da equação de Van Deemter, o termo C é tipicamente baixo, já que o transporte de massa é predominantemente convectivo e não há fase móvel estagnada. Na prática vai depender muito da porosidade do monolito, já que quanto maior o volume ocupado por mesoporos mais o transporte começa a se tornar difusional e lento, portanto aqui também há um compromisso entre eficiência/área superficial e permeabilidade.

No preparo de monolitos ocorrem reações de polimerização ou de policondensação para constituir a estrutura dos mesmos, que após lavagem dos componentes não reagidos e de solventes porogênicos dão origem aos macroporos e mesoporos. Essas reações são exotérmicas, o que forma um fluxo radial de calor de dentro da coluna para fora. O fluxo de calor de dentro para fora cria um gradiente na concentração de solventes porogênicos em função do raio da coluna, o que influencia no tamanho dos macroporos, resultando em não homogeneidade radial do tamanho dos mesmos. De acordo com Guiochon, isso aumenta a contribuição do termo A (coeficiente de difusão turbilhonar) na altura de prato para colunas monolíticas já que há

um alargamento de banda devido à caminhos preferenciais da fase móvel ao passar por poros com diferentes tamanhos [11].

O termo B em colunas monolíticas não tem grande magnitude já que as vazões utilizadas são tipicamente altas. Com o termo C baixo e o termo A alto, por mais que em vazões baixas as colunas de materiais finamente particulados apresentem maior eficiência, sob vazões altas colunas monolíticas se destacam na eficiência devido à menor correlação do aumento de prato com o aumento da vazão da fase móvel. Esse fato, juntamente com a presença de macroporos que conferem alta permeabilidade à coluna são os motivos pelas quais muitas análises podem ser feitas cinco ou seis vezes mais rapidamente com colunas monolíticas do que com colunas empacotadas [12]. Apesar da escolha do melhor tipo de coluna depender de fatores como disponibilidade de recursos, custos de manutenção e tempo de análise, as vantagens das colunas monolíticas são melhor observadas quando comparados os números de prato por pressão gerada. Enghardt et al. compararam colunas monolíticas comerciais com colunas particuladas de 3,0 μm de diâmetro em relação ao número de pratos teóricos por unidade de pressão gerada. Eles constataram que na vazão ótima uma coluna monolítica gerava 1900 pratos bar^{-1} enquanto a coluna de material particulado gerava apenas 310 pratos bar^{-1} [10].

Existem dois tipos de colunas monolíticas, as constituídas de polímeros orgânicos e as de sílica. As colunas monolíticas baseadas em sílica (Figura 3) têm a sua estrutura composta de uma sequência ininterrupta e ordenada de esqueletos de sílica, e possuem além de macroporos um volume significativo de mesoporos, o que garante uma alta área superficial para esse tipo de coluna, de até 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, razão pela qual esse tipo de coluna funcionalizada com grupos C18 é bem sucedida na separação de moléculas pequenas, mas não tem boa performance para separação de moléculas

grandes [9]. Em contraste, monolitos poliméricos são compostos de glóbulos e microglóbulos e em sua estrutura apresentam predominantemente macroporos com um volume pequeno de mesoporos (Figura 4, onde podem ser vistos os microglóbulos e os poros de fluxo), exibindo uma área superficial muito menor, na faixa de dezenas de $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. A ausência de poros pequenos e o fácil acesso a poros largos as tornam ideais para separações rápidas de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e até polímeros sintéticos por mecanismos de exclusão de tamanho [9]. Monolitos poliméricos têm boa estabilidade em temperaturas maiores que 60°C e pH maior que 8,5, condições em que monolitos de sílica podem sofrer reações e apresentar problemas de performance [16].

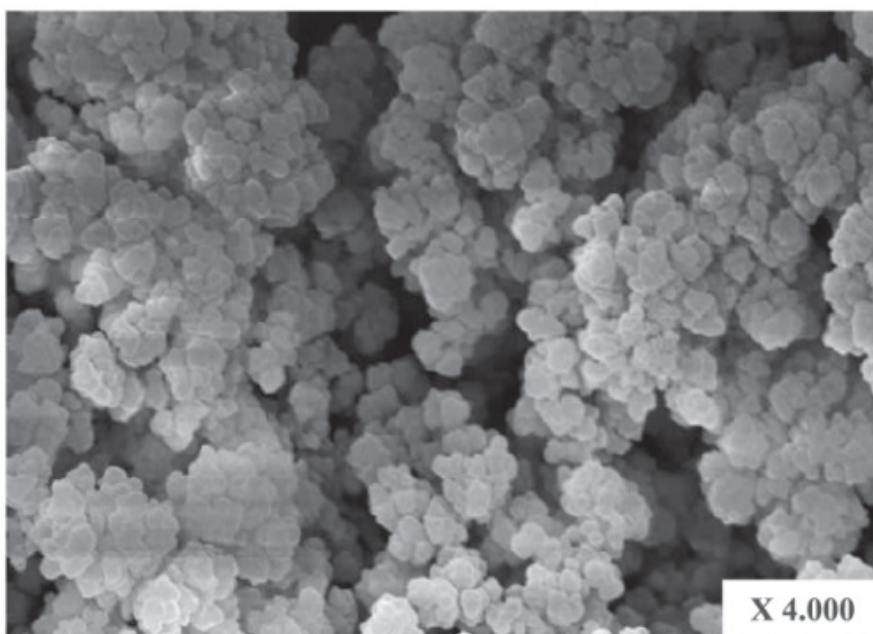


Figura 4: Imagem de MEV de um monolito polimérico baseado em poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etileno) (Adaptado da referência 5)

O preparo de monolitos de sílica é feito por um processo sol-gel. Em um procedimento típico, um precursor alcoxissilano é misturado com um solvente (álcool de cadeia curta ou polietileno glicol) e um catalisador (ácido ou base). O solvente deve tornar homogênea uma mistura de alcoxissilanos e catalisadores, além de funcionar

como agente porogênico. A reação ocorre com inserção da mistura resultante num molde e sucessivas etapas de evaporação, secagem e tratamento térmico para promover a hidrólise seguida da condensação do precursor. O produto se torna insolúvel e precipita. Dependendo das condições experimentais pode precipitar como partículas ou um monolito com poros de fluxo onde os solventes porogênicos e resíduos do monômeros estão localizados. A concentração dos reagentes e solventes porogênicos controlam a distribuição de tamanho desses poros. Após a separação de fase o monolito sofre um encolhimento acentuado dentro do molde. O cilindro monolítico é retirado do molde e encaixado em um tubo de material termoplástico (PEEK- polieter eter cetona) que, por sua vez, através de aquecimento e pressão externa, engloba e comprime o monolito em seu interior, assegurando a inexistência de espaços entre o monolito e o tubo. O monolito pode, posteriormente, ser funcionalizado para o modo de fase reversa ou troca iônica através de reação com um reagente silano apropriado [11,5]. O monolito de sílica final tem estrutura bastante definida e o tamanho dos poros (macro e meso) pode ser feito de modo independente. Em outras palavras é possível preparar colunas monolíticas de sílica com macroporos maiores ou menores, na faixa de 1-8 μm , enquanto o tamanho de mesoporos é mantido constante em 13 nm e vice-versa. Isso torna as colunas monolíticas de sílica únicas em relação às particuladas [13]. Apesar de ser um procedimento relativamente complicado, alguns fabricantes dominaram o conhecimento e patentearam, lançando no mercado as colunas monolíticas de sílica Chromolith (Merck) e Onix (Phenomenex) a partir do ano 2000. Hoje em dia elas são bem aceitas e bastante difundidas comercialmente para uso em equipamentos normais de HPLC [12].

A obtenção de monolitos constituídos de polímeros orgânicos é mais fácil pelo encolhimento ser muito menor, então é possível em apenas uma etapa obter o monolito

aderido ao tubo da coluna (especialmente no caso de capilares) pela polimerização *in situ*. No processo de obtenção de colunas monolíticas poliméricas é preparada uma mistura reacional homogeneizada e desoxigenada, composta de monômero formador de ligações cruzadas (divinílico), monômero funcional (monovinílico), solvente porogênico e iniciador, sendo promovida a copolimerização entre os monômeros. A combinação de monômeros formadores de ligação cruzada e monômeros funcionais é ajustada para alcançar o balanço necessário entre alto grau de entrecruzamento e suficiente densidade de funcionalidades reativas para subsequente aplicação ou modificação do material após a polimerização [15].

Tipicamente, a superfície interna das colunas é funcionalizada com um grupo de ancoramento, como [3-(metacrilóiloxi)-propil]trimetoxisilano (MPTS), que possui além de função vinílica, grupos metoxi que se ligam ao silanol na superfície interna da coluna após ativação da mesma. Após a etapa de fixação do grupo ancorador, grupos vinílicos ficam expostos na superfície interna do tubo, polimerizando com monômeros presentes na mistura reacional, formando ligações covalentes entre estrutura monolítica do polímero e o tubo da coluna [14]. A Figura 5 contém o esquema do processo de modificação descrito, a partir da modificação com MPTS dos grupos silanóis da parede. O ancoramento do monolito é importante para minimizar o seu encolhimento e, com isso, prevenir seu desprendimento do tubo a altas pressões e assim forçar a fase móvel a passar totalmente pela estrutura monolítica [15]. Além disso, a funcionalização é importante para que não fiquem espaços vazios entre o polímero e a parede interna do tubo, o que criaria caminhos preferenciais para a fase móvel, assim aumentando a contribuição do termo A da equação de van Deemter. Em relação às colunas particuladas, a aderência do monolito à parede do tubo dispensa a etapa de empacotamento, o que é uma grande vantagem operacional ao empregar colunas de

diâmetros reduzidos, que são difíceis de preencher. Ainda elimina o uso de filtro retentores de material particulado, que apresentam baixa reprodutibilidade e comprometem o desempenho cromatográfico da coluna. Para colunas monolíticas convencionais (de diâmetro interno > 2 mm) a razão raio:volume é tão pequena que não adianta funcionalizar o tubo, mas é importante no momento da polimerização colocar o tubo na posição vertical, pois os núcleos de polímero que se formam se depositam no fundo da coluna, fazendo com que o crescimento do polímero ocorra de baixo para cima [124]. Dessa maneira também não ficam espaços vazios na coluna, já que o espaço fica no topo da coluna

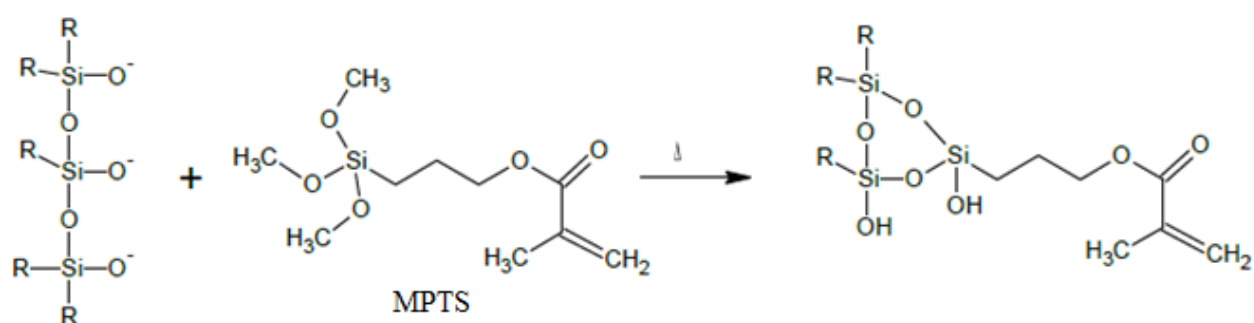


Figura 5: Esquema da reação de vinilização da sílica ativada da parede do capilar (adaptado da referência 5)

A reação de polimerização começa com a decomposição radicalar de um iniciador, usualmente 2,2- azobisisobutirolnitrila (AIBN), induzida por aumento da temperatura ou exposição à luz UV. No estágio inicial da reação, os núcleos de polimerização são formados e os monômeros formadores de ligação cruzadas são incorporados. A homogeneização da solução garante a nucleação homogênea, uma das razões porque o monolito preenche completamente qualquer conduíte [15]. Em estágios posteriores, o núcleo cresce de tamanho e uma estrutura polimérica altamente interconectada é formada. Finalmente, uma estrutura heterogênea e globular é formada,

preenchendo todo o espaço do tubo da coluna. O bloco monolítico é lavado para remover todos os componentes não reagidos da mistura de polimerização, bem como os solventes porogênicos [17]. Na Figura 6 são apresentados a reação da decomposição do iniciador radicalar AIBN por luz UV ou aumento da temperatura (a) e o seu subsequente uso na polimerização do polímero poli (GMA-co-EDMA) a partir dos monômeros glicidil metacrilato (GMA) e etileno dimetacrilato (EDMA) (b).

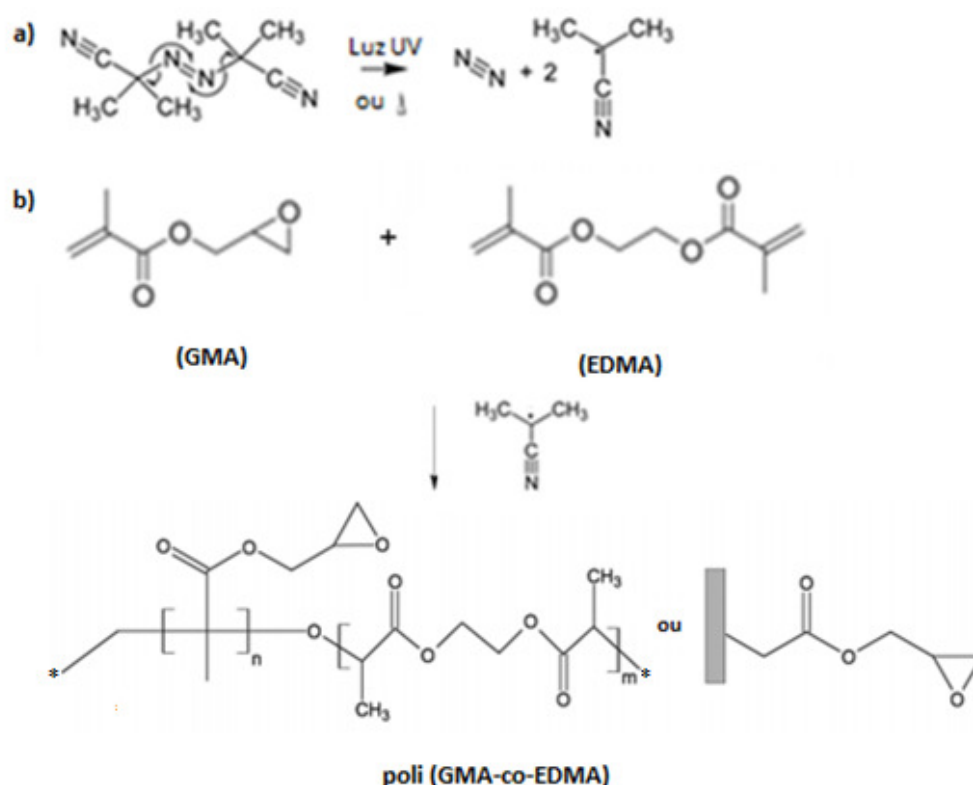


Figura 6: (a) Reação de decomposição térmica ou iniciada por luz UV do AIBN; (b) Reação de polimerização entre os monômeros GMA e EDMA para formar poli (GMA-co-EDMA). * representa a continuação do polímero (adaptado da referência 42)

Muitos monômeros disponíveis comercialmente são adequados para preparação dos monolitos, abrindo possibilidade de incorporar uma grande variedade de superfícies químicas aos mesmos. O requisito para utilizar o monômero como constituinte do monolito é basicamente que ele seja solubilizado pelo solvente porogênico. Já foram sintetizados monolitos poliméricos baseados em poliestirenos, polimetacrilatos,

poliacrilamidas, entre outros Na Figura 7 são apresentados alguns monômeros funcionais e formadores de ligações cruzadas comumente usados na formulação de poliestirenos, polimetacrilatos e poliacrilamidas, com destaque para alguns metacrilatos.

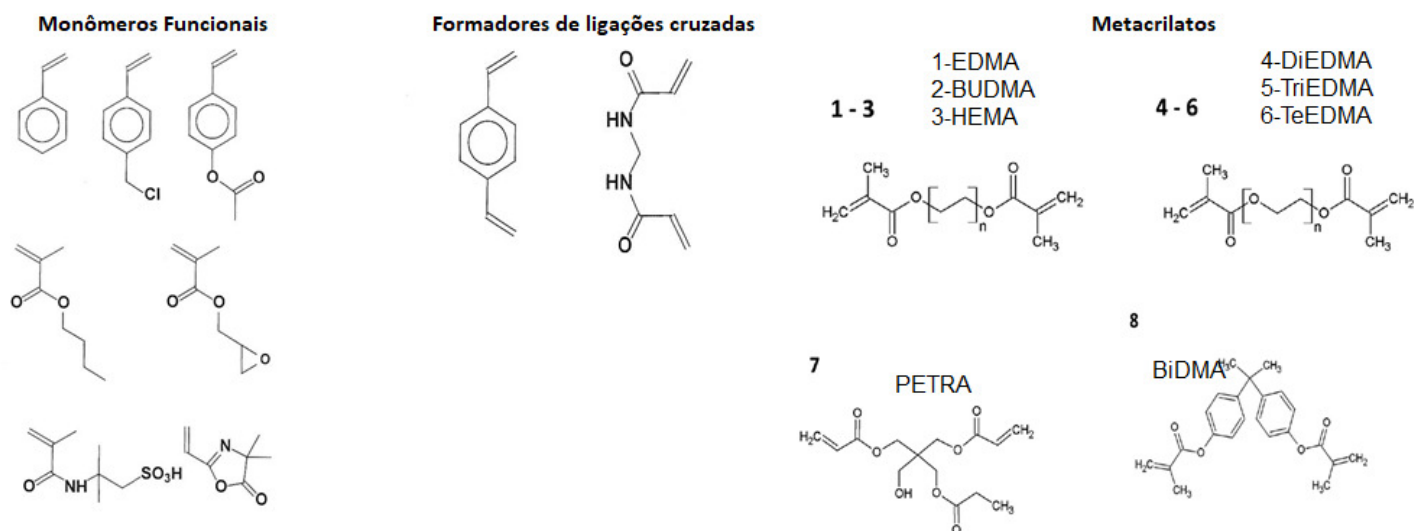


Figura 7: Monômeros funcionais e formadores de ligações cruzadas comumente usados na formulação de monolitos

Monolitos baseados em metacrilatos são bastante difundidos, pois seu preparo é simples e apresentam alta estabilidade química em relação ao pH, alta resistência mecânica e baixa susceptibilidade ao inchamento. Na formulação de metacrilatos normalmente é usado um monômero funcional como butil metacrilato (BMA), glicidil metacrilato (GMA), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) ou outro ester de metacrilato, que é polimerizado com etileno dimetilacrilato (EDMA) ou outro formador de ligações cruzadas, usando uma mistura de álcoois (1,4- butanodiol ou dodecanol) como solventes porogênicos. Modificações químicas pós-polimerização permitem introduzir funcionalidades químicas diversas enquanto é preservada a estrutura porosa do monolito. Glicidil metacrilato possui um grupo epóxi altamente reativo que por abertura o anel pode ser convertido a grupos apolares (butil, octil, fenil e outros), ou ainda a trocadores catiônicos ou aniônicos [17]. A reação de abertura do anel epóxi e

modificação do monolito base poli (GMA-co-EDMA) com um grupo iminodiacetato é mostrada na Figura 8.

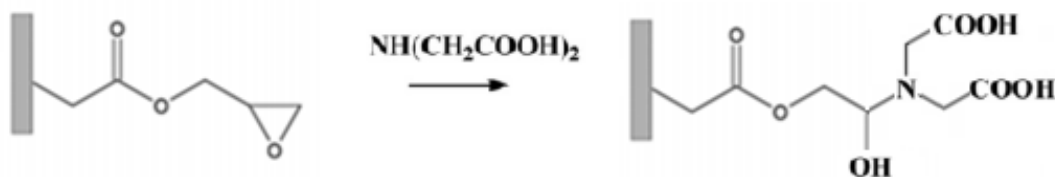


Figura 8: Modificação do monolito base poli (GMA-co-EDMA) por reação de abertura de anel epóxi com Ácido Iminodiacético

1.3. Separação de moléculas pequenas utilizando monolitos poliméricos

Os desafios atuais frente a monolitos poliméricos estão relacionados a melhorar a performance dos mesmos na separação de moléculas pequenas. O sucesso na separação de macromoléculas devido à baixa área superficial já é conhecido há algum tempo, e levou à patente do monolito poli (GMA-co-EDMA) pela empresa BIA Separations sob o nome de “Convective Interaction Media®” (CIM®). A empresa comercializa meios de separação baseados no polímero poli (GMA-co-EDMA) na forma de discos e colunas de alto volume interno para separação e purificação de biomoléculas [5].

A performance para separação de moléculas pequenas não é boa devido à falta de mesoporos, que são pequenos e garantem alta área superficial e elevada abundância de grupos funcionais para as interações que resultam na separação. Se na formulação do monolito a área superficial for muito grande no intuito de melhorar a separação de moléculas pequenas, concomitante ao aumento do volume ocupado por mesoporos ocorre uma diminuição do volume ocupado pelos poros de fluxo (macroporos). Como consequência, a contribuição do transporte convectivo diminui, assim como a eficiência da separação de moléculas grandes. Portanto, pode-se dizer que o mesmo fator que torna os monolitos poliméricos bons para separação de moléculas grandes (grande

porcentagem de volume ocupado por poros de fluxo) dificulta a separação de moléculas pequenas. O compromisso entre volume ocupado por mesoporos e o volume ocupado por macroporos tornaria impossível obter uma coluna de material particulado que apresentasse alta permeabilidade e alta área superficial, pois essas têm a porosidade fixa. Entretanto, em colunas monolíticas poliméricas o limite da tecnologia é ajustar independentemente o tamanho dos macroporos e dos mesoporos para que, na realização das potencialidades desse tipo de fase estacionária em HPLC, possa-se obter monolitos com alta permeabilidade e alta área superficial. Como foi citado anteriormente, isso é possível de se fazer com alta eficiência em monolitos de sílica que apresentam distribuição bimodal de macroporos (poros de fluxo) e mesoporos (responsáveis pelas interações e, portanto, pelas separações). Uma razão pela qual é mais difícil de fazer uma abordagem desse tipo em monolitos poliméricos é que a polimerização por propagação radicalar é naturalmente heterogênea, levando a estrutura mais heterogênea. Já os processos nos monolitos de sílica são mais controlados.

Nishang et al. atribuem a baixa performance para moléculas pequenas não somente ao baixo volume de mesoporos, mas também à falta de homogeneidade dos mesmos e à presença de microporos (poros de diâmetros menores de 2 nm), que podem promover um transporte de massa lento (difusivo) pois tais poros são preenchidos com fase móvel estagnada e aprisionam moléculas pequenas [15,16].

Os desafios, portanto, estão em controlar as propriedades porosas do monolito para melhorar a transferência de fase aumentando a quantidade de mesoporos e a homogeneidade dos mesmos, favorecendo assim o termo C da equação de Van Deemter, ao mesmo tempo em que é mantida a alta permeabilidade da coluna. Entre as estratégias para melhorar a performance para moléculas pequenas estão a otimização da composição da mistura reacional, controle do tempo da reação e controle da

temperatura. Adicionalmente as modificações pós-polimerização também podem ser utilizadas.

1.4. Estratégias para aumentar a área superficial de monolitos poliméricos

1.4.1. Solventes Porogênicos

Nos momentos iniciais da polimerização, a etapa de separação de fase é fortemente dependente da capacidade do solvente porogênico solubilizar os monômeros divinílicos ou monovinílicos, e influencia diretamente as características nanométricas do polímero formado, que por sua vez tem efeito marcante na sua performance. Se a solubilidade dos monômeros for alta, o polímero formado vai começar a precipitar em estágios posteriores da polimerização, em contrapartida, se o solvente for um solvente ruim a separação de fase ocorre rapidamente, logo após a formação dos primeiros núcleos de polimerização. Quando a solubilidade é baixa a separação de fase ocorre numa etapa em que os monômeros ainda não reagiram, e eles têm mobilidade para coalescer com os núcleos de polimerização, que nesse momento são um melhor solvente para o monômero do que o solvente. Com isso os núcleos aumentam de tamanho, dando origem a glóbulos maiores, conseqüentemente macroporos de maior tamanho e menor área superficial são formados. Já quando a solubilidade é alta a separação de fases ocorre tardiamente, com cinética adequada para os monômeros serem atacados por um número maior de núcleos de polimerização, e como o número de núcleos é maior o tamanho deles é reduzido, levando a glóbulos menores de maior área superficial.

Na tentativa de manipular as propriedades porosas de um monolito, a solubilidade dos monômeros pode ser alterada de duas maneiras: alterando a polaridade dos monômeros ou alterando a polaridade dos solventes. Em outras palavras pode-se alterar a composição dos monômeros para que o polímero tenha polaridade diferenciada, ou pode-se alterar a composição do sistema porogênico para que a

polaridade resultante favoreça a ocorrência das propriedades porosas desejadas. O parâmetro de solubilidade de Hildebrand fornece uma estimativa numérica do grau de interação entre substâncias e pode auxiliar na escolha de solventes e monômeros adequados para compor a mistura reacional se o objetivo for facilitar a formação de monolitos com alta área superficial (alta interação entre solventes e monômeros) ou alta porosidade (baixa interação entre solventes e monômeros). Como alternativa, podem ser adicionados co-solventes na mistura reacional para influenciar na transferência de fase, formando sistemas porogênicos binários ou terciários [21].

A escolha de diferentes solventes porogênicos é uma maneira de alterar a estrutura porosa dos monolitos sem alterar a sua composição química. Em geral solventes macroporogênicos dão origem a poros mais largos por antecipar o começo da separação de fase. Irgum et al. estudaram o emprego de polietileno glicóis (PEGs) dissolvidos em 2-metoxi-etanol como solvente porogênico de acrilatos e metacrilatos, mostrando que quanto maior o peso molecular do PEG maior eram os poros [20]. Eles também monitoraram o efeito do uso de diferentes solventes como co-solventes sobre as propriedades porosas dos monolitos.

A escolha do solvente porogênico não é trivial, e pequenas alterações na composição do sistema porogênico podem alterar significativamente a estrutura do monolito. Por isso, cada mistura reacional que tem seu sistema porogênico alterado deve ter suas condições otimizadas [17, 18].

1.4.2. Monômeros

Ao contrário do solvente porogênico, a variação na composição dos monômeros altera a superfície química, além de induzir a formação de diferentes estruturas porosas. Uma maior concentração de monômeros divinílicos promove diretamente a formação

polímeros interligados nos estágios iniciais da polimerização e leva a uma separação de fase precoce. Embora esse efeito seja igual ao de um solvente ruim na mistura reacional, os núcleos têm mais ligações cruzadas, e como esse grau de ligações cruzadas afeta negativamente a incorporação de outros monômeros, os núcleos permanecem pequenos. Os pré-globulos ainda podem capturar os núcleos gerados em estágios posteriores da polimerização, mas não ocorre uma verdadeira coalescência. Como a estrutura do monolito final tem glóbulos menores, ela também tem menores espaços vazios. Então o aumento da quantidade de monômeros divinílicos é uma abordagem útil na preparação de monolitos de alta área superficial. Entretanto, por essa abordagem, alterar a composição do monolito pode não ser a mais recomendada se é desejado incorporar o máximo possível de monômero funcional ao mesmo tempo em que se deseja maximizar a área superficial [17].

A porcentagem de monômero:solvente e monômero formador de ligação cruzada:monômero funcional afeta as propriedades porosas e conseqüentemente as propriedades morfológicas do monolito. A polaridade dos monômeros é um dos fatores chave que regem a separação de fase e a formação dos poros. Além disso, monômeros com cadeias carbônicas mais longas têm hidrofobicidade aumentada [19]. Waguespack et al. constataram que a substituição de pequenas quantidades do monômero acrilato de butila por acrilato de laurila de maior cadeia carbônica e maior hidrofobicidade, levou à formação de microglóbulos ligeiramente menores, aumentou o número de mesoporos, melhorou a separação de moléculas pequenas e aumentou a retenção no modo de fase reversa [22]. Em um estudo similar, Urban et al. substituíram butil metacrilato do copolímero poli(BMA-co-EDMA) por lauril metacrilato, ciclohexil metacrilato, 2-etil hexil metacrilato e estearil metacrilato, conseguindo uma melhor eficiência de separação para alquilbenzenos (moléculas pequenas) com a coluna sintetizada com o

grupo lauril. Segundo os autores, o uso do lauril como cadeia alquílica no monômero funcional melhorou o espaçamento dos mesoporos e isso garantiu melhor eficiência para a coluna composta com esse monômero do que com os outros [19].

1.4.3. Temperatura

A temperatura de polimerização exerce influência na cinética de polimerização e o controle dela é um meio de obter um monolito com diferentes propriedades porosas a partir da mesma composição de mistura reacional. O efeito da temperatura está relacionado à taxa de nucleação, e a mudança da distribuição dos tamanhos de poros ao alterar a temperatura pode ser atribuída à diferença no número de núcleos ao realizar essa mudança. Quando ocorre a separação de fases, os primeiros núcleos altamente inter cruzados se tornam melhores solventes para o monômero do que os solventes porogênicos, então a tendência é a polimerização local pela grande concentração de monômeros na superfície dos núcleos. Quando a temperatura é baixa a reação de polimerização é lenta e pode ocorrer uma transferência significativa de monômeros da solução para o núcleo. Quando a temperatura é alta aumenta a quantidade de polímeros formados em solução após a etapa original de nucleação, que são então capturados por núcleos em crescimento e resultam na formação de glóbulos maiores. Isso resulta na diminuição da área superficial. Em temperaturas muito altas a polimerização ocorre ainda mais rápido e as cadeias de polímeros são transformadas em glóbulos individuais, em vez de serem capturados por núcleos. Esses glóbulos são pequenos, e consequentemente a área superficial é alta [18].

1.4.4. Tempo de polimerização

O tempo de polimerização determina diretamente a taxa de conversão dos monômeros. Então quanto maior o tempo de polimerização maior o tamanho dos glóbulos, e menor a área superficial. Ao mesmo tempo, se o tempo for pequeno a conversão é baixa, e os poros são pequenos, com maior área superficial. Svec e Frechet prepararam um monolito sintetizado durante apenas uma hora que apresentou área superficial de $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e volume de poro $3,8 \text{ mL g}^{-1}$ com conversão de apenas 18% dos monômeros [23]. O mesmo monolito sintetizado por 22 horas tinha a conversão quase total, com a área superficial e volume de poro diminuído para $120 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e $1,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Resultados interessantes são obtidos com tempos bastante curtos de polimerização, assim como relataram Bonn et al., que separaram pequenas moléculas derivadas de fenol com a alta eficiência de $65000 \text{ pratos m}^{-1}$ usando uma coluna sintetizada por apenas 45 minutos com 39% de conversão. A eficiência diminuía gradualmente com o aumento do tempo de polimerização até que ficava inaceitável com a coluna polimerizada por 24 horas [24]. Apesar de ser uma estratégia menos comum para controlar as propriedades porosas a reprodutibilidade coluna a coluna é questionável e precisa ser demonstrada [18].

1.4.5. Modificações pós-polimerização e UV grafting

Na modificação de monolitos feita com a reação direta entre agentes modificadores e grupos funcionais reativos do monolito, assim como a reação de abertura de anel do grupo epóxi no monolito poli(GMA-co-EDMA) mostrada na Figura 8, apenas uma funcionalidade é obtida para cada sítio ativo da superfície. Em contraste, pode ser feito o enxerto (ou em inglês, *grafting*) de cadeias de polímeros na superfície de monolitos base. Os polímeros podem ter maior densidade de grupos funcionais,

emanando de cada grupo funcional individual proveniente da sua estrutura, em vez de apenas um, como na modificação direta do grupo reativo. Por isso o grafting pode ser usado para aumentar drasticamente a quantidade de sítios ativos na superfície do monolito.

Um fato importante na polimerização de monolitos sintetizados a partir de monômeros funcionais monovinílicos e formadores de ligações cruzadas divinílicos em uma única etapa é que os monômeros funcionais também estão presentes nas camadas interiores do polímero, embora que em menores proporções (já que na etapa de formação os monômeros divinílicos têm maior taxa de reação, por terem maior quantidade de ligações duplas). Isso pode deixar os grupos funcionais do monômero funcional inacessíveis para interações, sem contar que se o monômero funcional for raro ou difícil de obter, ele estaria sendo desperdiçado com a polimerização em uma etapa, pois estaria sendo consumido para constituir o interior do polímero. Além disso a polimerização em uma etapa se mostrou uma difícil rota de obter um monolito com grandes macroporos e uma multiplicidade de pequenos poros. Por isso formas alternativas precisaram ser desenvolvidas [18]. Modificações como o grafting de polímeros reativos se mostraram uma melhor maneira de utilizar o monômero funcional em etapas mais controladas, o que permite maior controle sobre as propriedades porosas, e com a possibilidade de aumentar a quantidade de sítios ativos na superfície do monolito onde estarão acessíveis para interação.

O processo de grafting permite melhorar as propriedades porosas de um monolito base separadamente do processo de modificação da sua superfície química. Em outras palavras o pesquisador pode otimizar o processo de obtenção do monolito base primeiro e depois modificar o mesmo com uma grande variedade de agentes

químicos. Isso é útil para estudar separadamente efeitos de superfície química na separação, já que a estrutura porosa do monolito base vai ser a mesma [18].

O processo mais comum de grafting é através do fornecimento de luz UV para decompor iniciadores fotossensíveis, como cetonas aromáticas, que auxiliam na formação de radicais que vão preceder a reação. A reação é iniciada usando benzofenona como fotoiniciador, que ao ser excitada com luz UV à 200-300 nm abstrai átomos de hidrogênio da superfície do polímero e leva à formação de um radical de alta energia na superfície, que pode ser atacado por monômeros e iniciar o processo de grafting a partir da superfície do polímero [18]. Como alternativa, em vez de aplicar iniciador e monômero simultaneamente, pode ser feito o grafting em duas etapas, com imobilização do iniciador na superfície do polímero na primeira etapa e aplicação do monômero na segunda etapa (Figura 9). Ambas as etapas são iniciadas com luz UV. Na primeira etapa, a ausência do monômero faz com que o radical formado na superfície do polímero se combine com o radical semipinacol recém-formado a partir da benzofenona, que é imobilizado. Na segunda etapa o monômero é colocado em contato com o monolito sem o iniciador, e a polimerização a partir da superfície do polímero é iniciada [18, 25].

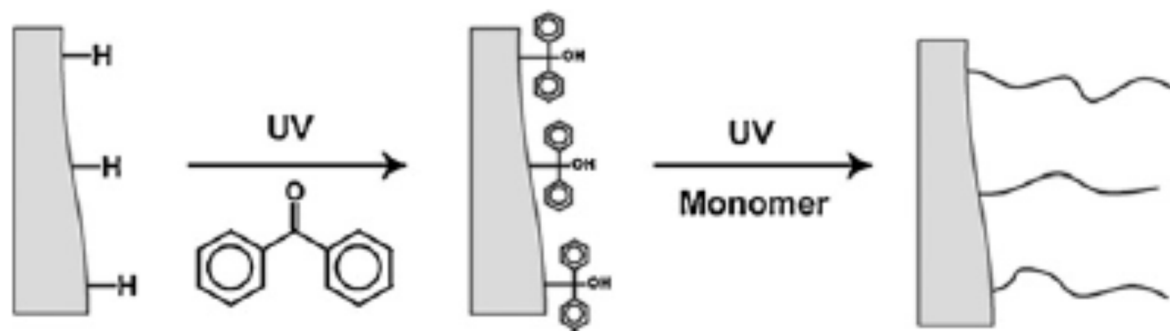


Figura 9: Esquema do procedimento de fotografting em duas etapas [25]

O fotografting em duas etapas é uma maneira de diminuir a formação de polímero em solução que não participa do processo de grafting e consome uma quantidade significativa de monômero disponível para o processo, além de poder causar obstrução dos poros e formação de gel na superfície [25]. O processo em duas etapas também permite a otimização individual de cada etapa, o que aumenta o controle sobre o processo, como por exemplo, no caso da benzofenona e o monômero não serem solúveis no mesmo solvente, esse problema é contornado [18].

A desvantagem do fotografting é a necessidade de utilizar moldes e monômeros transparentes à luz UV. Assim capilares recobertos com poliimida e monômeros aromáticos não podem ser utilizados. Também, devido à absorção de luz UV do próprio monólito, o fotografting funciona somente em colunas em que o diâmetro é pequeno, basicamente colunas capilares e transparentes [18].

Outras formas de modificação pós-polimerização podem ser citadas, como *hyper crosslinking*, *click chemistry*, modificação com nanopartículas metálicas e uso de nanoestruturas de carbono. Essas não vão ser discutidas em detalhe, podendo ser encontrados em algumas revisões [18,26, 27]. Jiri Urban destaca em sua revisão de 2016 que o número de protocolos possíveis para preparação de monólitos poliméricos usados na separação de moléculas pequenas é alto, destacando-se as estratégias de pós-polimerização e ajuste preciso das condições de polimerização e tipo de iniciação [26]. Ele afirma que pela variedade de estratégias, um pesquisador sempre pode encontrar um procedimento que forneça as propriedades necessárias para a separação.

1.5. Aplicações menos comuns de monolitos poliméricos

As propriedades de alta permeabilidade com áreas superficiais relativamente altas motivaram o uso de colunas monolíticas em outras técnicas além de cromatografia líquida, em que são desejados suportes com essas características. Inicialmente monolitos foram usados em modos cromatográficos em que colunas particuladas também são utilizadas, como cromatografia líquida capilar (*Capillary liquid chromatography*, CLC), eletrocromatografia capilar (*Capillary electrochromatography* CEC) e eletroforese capilar (*Capillary electrophoresis*, CE), além de pré-concentração e preparo de amostras por extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE). O uso de monolitos se mostrou mais vantajoso em diversas dessas aplicações, principalmente pela facilidade de obtenção da fase estacionária sem a necessidade de empacotamento de colunas capilares.

1.5.1. Extração em fase sólida (SPE)

Assim como a cromatografia, a SPE pode ser realizada em coluna, com a adsorção do analito seguida de lavagem e eluição. Desse modo a SPE é considerada um método de separação binário, pois, idealmente, retém totalmente o analito e depois elui totalmente, descartando interferentes em etapas de lavagem intermediárias. O fator mais importante na SPE, entretanto, não é relacionado à eficiência de separação entre componentes, mas sim à capacidade do leito de adsorver seletiva e quantitativamente o analito para em seguida liberá-lo em uma quantidade pequena de solvente. Isso está relacionado a obter um monolito com a maior área superficial possível. Apesar de terem área superficial tipicamente menor do que colunas particuladas, a permeabilidade das colunas monolíticas é maior, o que permite o processamento de um maior volume de

amostra por unidade de tempo devido à maior vazão trabalhável, diminuindo o tempo dos processos de extração [28].

A polaridade do suporte sólido da SPE pode ser ajustada com incorporação de um monômero hidrofóbico na mistura reacional quando a intenção é reter analitos apolares ou com monômeros hidrofílicos quando é desejável adsorver analitos polares. Além do controle da polaridade, as modificações pós-polimerização podem fornecer funcionalidades altamente específicas na superfície do monolito que vão garantir uma alta seletividade para a SPE. A imobilização de anti-corpos (Imunoglobulina G de coelhos e anti-FITC – *monoclonal anti fluorescein isothiocyanate*) sobre o monolito base de poli (GMA-co-EDMA) pôde ser feita por diferentes rotas, gerando monolitos de afinidade de grupo funcional para imunoextração ultrarrápida, que tiveram avaliados a velocidade e capacidade de extração do analito modelo (fluoresceína). Nesse estudo a eficiência de imobilização dos anticorpos foi avaliada em cada rota de síntese [29]. Tal flexibilidade da superfície química é ausente nas colunas de sílica, sejam elas particuladas ou monolíticas.

A tendência de miniaturização encontrada em diferentes técnicas analíticas, especificamente na coluna de separação, limita o volume injetado a valores baixos para manter a eficiência da coluna, e isso leva a problemas de sensibilidade na detecção do pico cromatográfico. A SPE tem sido acoplada on-line com CE e CLC como uma maneira de enriquecer o analito a partir de um grande volume de amostra pouco concentrada e assim aumentar a sensibilidade dessas técnicas [28]. Uma outra característica interessante da SPE online é que o analito é eluído diretamente para a coluna cromatográfica/detector, sem necessidade de evaporação do solvente e redissolução, etapas que são muito mais lentamente executadas no modo off-line. Como

não é necessário a evaporação do solvente, usa-se muito menos amostra e essa é, integralmente enviada para a coluna ou detector [43].

A estratégia de SPE acoplada on-line a CE comumente envolve a conexão de um capilar contendo um pré-concentrador monolítico na extremidade de entrada do capilar de separação ou ainda a formação do monolito extrator apenas em uma seção da extremidade do capilar (pela introdução da mistura reacional e fornecimento da luz UV somente em uma janela criada na extremidade) [35]. A Figura 10 ilustra o procedimento de SPE-CE. Com o monolito funcionalizado para adsorver o analito fixado na extremidade, é injetado no sorvente um grande volume de amostra (Figura 10A). Em seguida pode ser injetado um volume de água para limpeza e remoção dos componentes não adsorvidos da amostra (Figura 10B). Após o carregamento e limpeza é injetado um plugue de eluição, um pequeno volume de uma solução adequada para reverter a afinidade do analito com o monolito polimérico (Figura 10C) e subsequente separação pela eletroforese com injeção do tampão de separação (Figura 10D). Isso resulta em aumento da detectabilidade com o mínimo de manipulação da amostra. Um aumento ainda maior da sensibilidade pode ser alcançado quando a composição do plugue de eluição e o tampão de separação permitem focalização “*on-column*” [36].

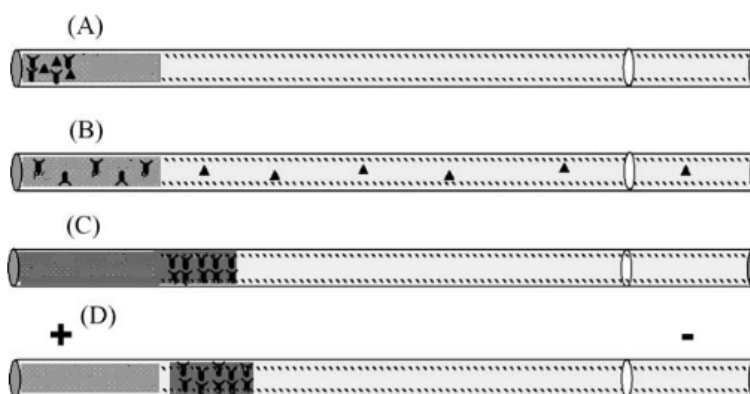


Figura 10: Representação do procedimento da SPE-CE (adaptado da referência 37)

A SPE acoplada à CLC é feita com o auxílio de uma válvula de injeção de seis portas, onde são conectadas as colunas monolíticas de pré-concentração (no loop da válvula de injeção, que é comutada com alteração da posição da mesma) e a coluna de separação da cromatografia líquida. Primeiramente é bombeada a quantidade de amostra desejada para o módulo de extração com a válvula na posição de carregamento, onde o analito vai ser retido e os compostos não retidos são levados ao descarte. Após o carregamento a válvula de injeção comuta para a posição de injeção e a bomba de eluição elui os analitos para a coluna de separação onde são separados. Esse procedimento permite aumentar o volume de amostra injetado mesmo com a técnica suportando volumes pequenos, elevando a sensibilidade para os sistemas de CLC [39, 28]. O acoplamento on-line de dispositivos de SPE e tratamento de amostra com cromatografia líquida foi revisado recentemente por Pan et al. [34].

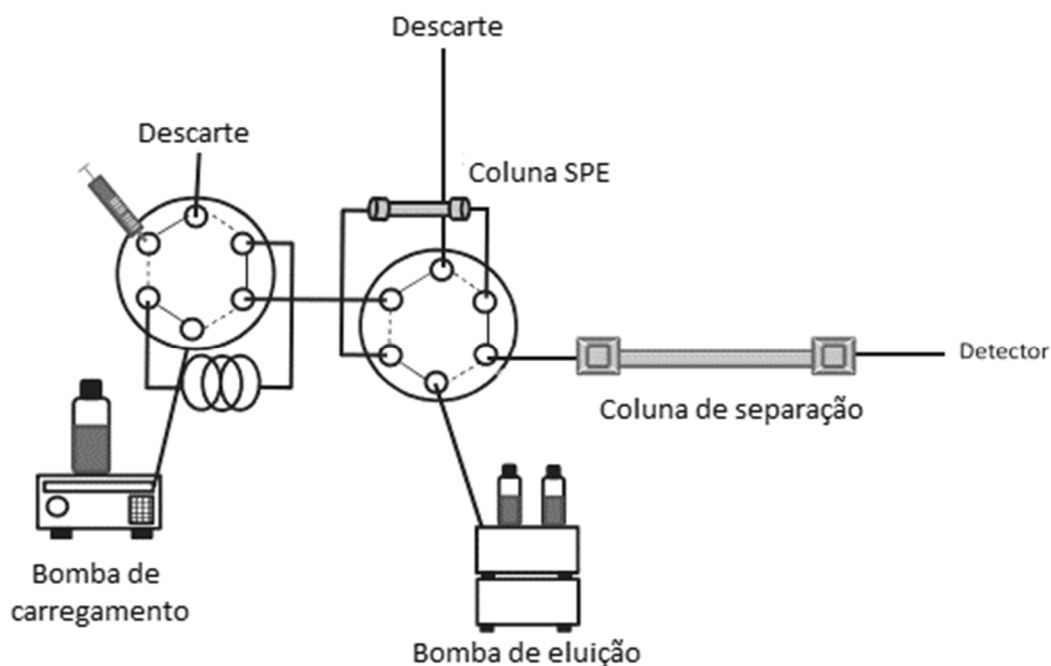


Figura 11: Sistema de SPE-CLC equipado com duas bombas mostrado no modo de carregamento da alça de amostragem/separação cromatográfica (adaptado da referência 39)

As aplicações de monolitos poliméricos para SPE são basicamente on-line, impulsionado pela facilidade de inserção da coluna em linha sem aumento da pressão do sistema e também pela facilidade de miniaturização, já que são preparados mais facilmente em capilares pela polimerização da mistura reacional introduzida na coluna capilar, com possibilidade de limitar a região polimerizada somente a regiões que recebem a iniciação por luz UV. Svec comenta que em aplicações off-line bem estabelecidas com sorventes de materiais particulados, dificilmente monolitos vão chegar a ter um papel de destaque, mas que aparentam ser promissores em pequenos dispositivos como capilares e chips microfluídicos [28]. A primeira revisão sobre materiais monolíticos usados como suporte para SPE foi lançada em 2006 por Svec [28], seguido de Potter e Hilder em 2008 [44], Namera et al. em 2011 [45] e Namera e Saito em 2013 [46]. Em 2017 Masini e Svec revisaram os artigos lançados a partir de 2010 que utilizaram monolitos para SPE exclusivamente em acoplamentos on-line, e o número e variedade de aplicações confirma o potencial comentado por Svec mais de 10 anos antes. Nessa revisão os autores separaram as aplicações entre extração de metais e semi-metais e extração de analitos orgânicos [43].

1.5.2. Hifenação

A separação em colunas monolíticas capilares é adequada para ser incluída em técnicas multidimensionais. Já é bastante relatado o acoplamento on-line de colunas monolíticas poliméricas com espectrometria de massas (MS), que apesar de ser uma técnica sensível e seletiva é limitada em relação à separação dos componentes da amostra, levando ao surgimento de técnicas hifenadas como SPE-ESI-MS/MS e RP-HPLC-ESI-MS/MS (ESI = *electrospray ionization*)[30,31,32]. No campo da proteômica, apesar da MS ser uma técnica poderosa, é quase impossível identificar

diretamente uma proteína sem preparo e tratamento de amostra [31]. Nesse tipo de análise as amostras usualmente têm volume de apenas poucos microlitros ou menos, portanto os sistemas são quase sempre miniaturizados para diminuir o consumo de amostra e reagentes, reduzidos à nanoescala, em que a separação é feita exclusivamente em colunas capilares [34]. Por isso, o uso de monolitos poliméricos se torna bastante sinérgico pois além de serem capazes de separar bem macromoléculas, são facilmente adaptados às dimensões capilares pela preparação da coluna capilar. A pressão também se mantém baixa devido à sua alta permeabilidade, importante para manter constante o fluxo até o ionizador por electrospray.

1.5.3. Aplicações em dispositivos de microanálise

Dispositivos de análise microfluídicos (μ -TAS, *micro total analysis system*) alcançaram um sucesso inegável em várias aplicações, mas alguns problemas persistem. A maioria dos dispositivos ainda é formado por canais abertos, que têm pouca área superficial e dificulta aplicações como separações cromatográficas, catálise heterogênea e SPE. A integração de materiais de alta área superficial é vantajosa pois aumenta a quantidade de material processada pelo dispositivo, assim aumentando a intensidade do sinal e a confiabilidade analítica. Ainda que tentativas de aumentar a área superficial com o preenchimento dos microcanais por partículas tenham sido feitas, o processo não foi muito bem sucedido por dificuldades técnicas [40]. Em contraste, as características de alta área superficial, alta permeabilidade, superfície química ajustável e polimerização delimitada a áreas bem definidas do dispositivo tornam monolitos porosos poliméricos adequados para aplicações microfluídicas. Os concentradores monolíticos podem ser formados nos canais do dispositivo pela inserção da mistura reacional otimizada e uso de uma máscara que confina a polimerização a regiões

expostas à radiação enquanto nenhuma polimerização ocorre nas áreas escuras, resultando num dispositivo similar ao apresentado na Figura 12. Esse dispositivo foi usado para pré-concentração e SPE de peptídeos e proteínas [40].

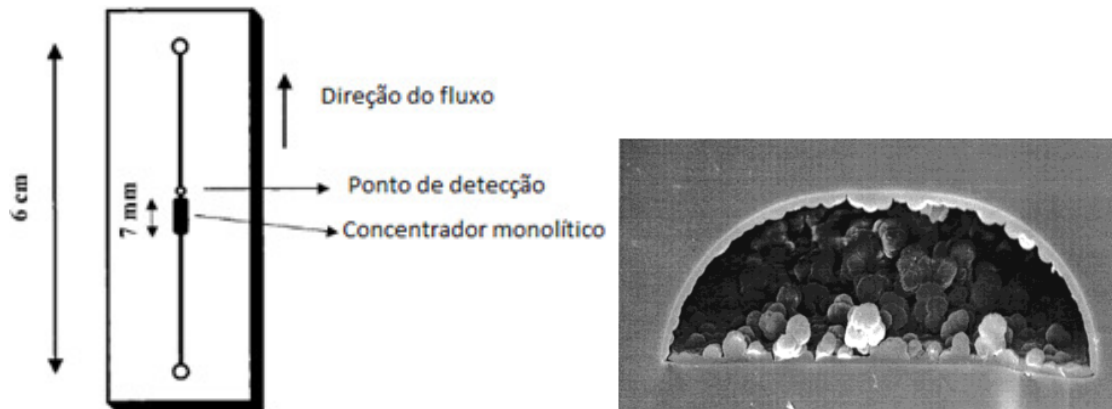


Figura 12: Dispositivo de análise microfluídico que utiliza polímero como concentrador e imagem de MEV do concentrador no canal (adaptado da referência 40)

Dispositivos de microanálise também podem se beneficiar da tecnologia de polímeros para recobrir a superfície de canais internos. O processo de fotografting em duas etapas citado anteriormente é utilizado para aumentar a hidrofiliabilidade da superfície dos canais internos e tornar dispositivos mais resistentes à adsorção de proteínas, evitando perdas de analito por adsorção nas paredes do dispositivo [25, 28]. Ainda existem outras aplicações menos comuns de monolitos poliméricos que não foram citadas, tais como suportes para imobilização de enzimas, bioengenharia, síntese orgânica em fase sólida, síntese combinatorial, análise por injeção em fluxo, entre outras.

CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE METAIS UTILIZANDO COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS COMPLEXANTES ASSISTIDA POR ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL E DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Poluição de metais

Metais exercem impacto ambiental durante todo o seu ciclo de utilização, desde a extração das reservas naturais, quando são destruídas a vegetação e os relevos naturais para construir minas de prospecção, até depois do descarte, quando podem entrar em contato com corpos aquáticos e ser assimilados por microrganismos, sendo inseridos na cadeia alimentar. Com a diversificação e ampliação do uso de metais, hoje é quase impossível evitar que um corpo aquático esteja em contato com algum metal de origem antropogênica, como evidenciado por Schroeder e Darrow num estudo que estima que as pessoas hoje estão sujeitas a concentrações de Cd e Pb 500 vezes maiores do que na antiguidade [47]. Uma vez dispersos no ambiente, metais permanecem por longos períodos, assumindo formas físico-químicas diversas, mas nunca desaparecendo por completo por serem poluentes inorgânicos e não biodegradáveis. Enquanto alguns metais são micronutrientes em baixas concentrações, eles podem ter efeito adverso à saúde em uma concentração não muito acima do nível saudável. É o caso do cobre, que tem função no processo de fixação do ferro na hemoglobina do sangue, mas ao ser ingerido em excesso passa a ser encontrado na forma livre, a qual pode se ligar a enzimas que de outra forma não complexariam este metal. É conhecido que excesso de cobre no organismo causa lesões no fígado [48]. Outros metais, como o cádmio e o chumbo, não têm função biológica e são tóxicos em qualquer concentração, causando inúmeros problemas de saúde. O cádmio é um metal muito tóxico e acumula-se principalmente nos rins e no fígado, podendo agir como inibidor de enzimas que têm zinco como constituinte, e em concentrações muito altas pode substituir os íons cálcio

nos ossos, tornando-os então porosos e frágeis, uma vez que cádmio e cálcio apresentam a mesma carga e aproximadamente mesmo tamanho. O chumbo é extremamente tóxico e causa efeitos neurológicos, interfere na produção de hemoglobina podendo levar à anemia, além de causar danos irreversíveis aos néfrons, o que diminui a eficiência da excreção de ácido úrico [48]. Sendo assim o monitoramento exato das quantidades de metais traço em reservatórios naturais de água é uma questão de saúde pública. Órgãos ambientais ligados a governos do mundo todo, tais como a USEPA nos EUA e o CONAMA no Brasil, estipulam as concentrações máximas permitidas de diversos metais em corpos d'água de reservatórios e rios.

A quantificação de metais traço em águas não é tarefa fácil porque eles estão presentes em concentrações muito baixas, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou menos. Técnicas de alto custo instrumental como Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido utilizadas para esse fim. Métodos eletroanalíticos, conhecidos por utilizar instrumentação de baixo custo, como potenciostatos operados a bateria e sensores impressos, podem alcançar detectabilidade similar a das técnicas espectrométricas e cumprir a demanda da quantificação dos metais traço, desde que eletroativos, em amostras de águas naturais[49].

Águas naturais são matrizes complexas que contém uma grande quantidade de possíveis interferentes endógenos. É comum encontrar em águas naturais precursores inorgânicos do solo e das rochas que são levadas até a água por erosão (como oxidrilos de ferro, carbonatos, cloretos, manganês e alumínio assim como argilominerais silicatados), e também ligantes heterogêneos de ocorrência natural como substâncias húmicas e fúlvicas, resultantes da decomposição de matéria orgânica, além de também serem encontrados material orgânico particulado e microrganismos.

Esses potenciais interferentes, e muitos outros existentes, de maneira geral podem “mascarar” o sinal referente ao analito, principalmente se estiverem em concentrações muito maiores do que o mesmo, o que frequentemente ocorre. Potenciais ligantes podem distribuir o metal em diferentes formas químicas, o que dificulta a determinação precisa da sua concentração. A interferência pode ocorrer de várias maneiras, dependendo do método de detecção. Nos métodos eletroquímicos uma grande fonte de interferência são os ligantes orgânicos, que ao formarem complexos inertes com os metais, os deixam indisponíveis para a determinação. A formação de complexos com substâncias húmicas pode também interferir nos resultados das análises, pois devido à natureza polieletrólítica e heterogênea desses ligantes, os coeficientes de difusão dos complexos são menores do que os dos íons metálicos livres, afetando o transporte de massa para a superfície do eletrodo de trabalho. Além disso, muitos ligantes orgânicos, especialmente as substâncias húmicas, interferem ao adsorver sobre o sensor eletroquímico, passivando-o. Outra fonte de interferência em métodos eletroquímicos é a formação de intermetálicos entre analito e metais endógenos, que são pré-concentrados no eletrodo. Em métodos espectroscópicos a matriz pode causar obstrução dos sistemas de introdução de amostras quando estas contêm sólidos dissolvidos em concentrações maiores que 0,2 % m v⁻¹ [50, 53]. Todos esses problemas levam a resultados imprecisos e inexatos das análises.

Os problemas causados pela interferência da matriz em águas naturais podem ser contornados usando a quantificação por adição de padrão, mas para a análise de traços, métodos de extração prévios à análise podem ser mais adequados, pois podem purificar e concentrar o metal, além de separar o mesmo da matriz complexa. No caso do acoplamento on-line da extração, o tratamento de amostra não é prévio à análise instrumental, como na extração off-line, mas é integrado a ela, estratégia importante

para eliminar perdas por transferências, evitar contaminação, aumentar o grau de automação e analisar todo o volume do extrato, visando com isso aumentar a sensibilidade, precisão e exatidão da análise [51].

2.1.2. Preparo de amostras e extração em fase sólida (SPE)

O preparo de amostra é considerado a etapa crítica da análise química, a que consome o maior tempo da análise e causa a maioria dos erros nos resultados, e que não podem ser corrigidos no decorrer da análise, então o preparo de amostra é considerado o gargalo no procedimento analítico [53]. A transferência de material de uma fase para a outra é o conceito fundamental na separação de uma espécie química da sua matriz. A extração líquido-líquido (LLE) foi o primeiro tipo de extração utilizada para o preparo de amostras, baseado no princípio de que o analito pode se distribuir em certa proporção entre dois solventes imiscíveis, um aquoso e um orgânico. Ela ainda é empregada, pela sua alta eficiência, fácil operação e baixo custo, mas gera uma grande quantidade de solvente ambientalmente nocivo, não é facilmente automatizada e durante o processo pode ser formada emulsão [85]. A extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvida para contornar esses problemas e se tornou a alternativa mais popular e mais ambientalmente correta do que LLE [50].

SPE é uma estratégia amplamente utilizada para limpeza de amostras e aumentar sensibilidade, seletividade ou ambos [51]. Em geral a SPE consiste na transferência do analito (ou analitos) da amostra líquida para o sorvente sólido, seguida da eluição. Um típico ciclo de separação ou pré-concentração do analito consiste em: (i) Condicionamento: um solvente ou solução adequada passa pelo sorvente para ativar grupos funcionais, e seu excesso é removido; (ii) Carregamento: um volume de amostra definido é colocado em contato com o sorvente que retém o analito; (iii) Lavagem: uma

solução de lavagem é enviada pela coluna e remove o que restou dos componentes não retidos da amostra; (iv) Eluição: o eluente passa pelo sorvente liberando o analito [52]. A SPE é mais fácil e rápida de ser realizada do que a LLE por não ocorrer a formação de emulsão. Também expõe menos o operador a amostras perigosas e a solventes orgânicos tóxicos, tem maiores fatores de pré-concentração e polui menos o ambiente, já que reduz o consumo de solventes orgânicos tóxicos. É relativamente barata, já que o sorvente pode ser regenerado e reutilizado por muitos ciclos, e é mais facilmente automatizada e adaptada para o acoplamento on-line em sistemas de análise em fluxo, facilitando a hifenação e a combinação com diferentes técnicas de detecção [50].

O acoplamento on-line da SPE com sistemas de detecção melhora a etapa de tratamento de amostra pois torna a metodologia mais rápida, precisa e diminui o consumo de solventes. Metodologias de SPE on-line têm várias vantagens sobre os procedimentos off-line. As etapas de condicionamento, lavagem e eluição podem ser feitas automaticamente, uma imediatamente após a outra, minimizando o tempo de análise, a imprecisão do procedimento e o trabalho intenso do operador na extração off-line. Alguns sistemas também permitem extração em uma amostra enquanto a outra está no sistema de detecção [50]. Outras vantagens importantes são a redução do risco de contaminação de amostras ou dos extratos de amostra imobilizados no sorvente e a minimização de perdas de analito por evaporação ou degradação durante a pré-concentração. Altas sensibilidades, baixos limites de detecção e pouco consumo de amostra também podem ser alcançados com as configurações on-line pela transferência e análise da totalidade das espécies extraídas para os sistemas de detecção, enquanto num procedimento off-line é analisada apenas uma alíquota do extrato.

2.1.3. Sorventes usados em SPE

SPE é um método seletivo pela alta variedade de sorventes de diferentes funcionalidades, desde fase reversa (C8, C18), troca iônica e modo misto (troca iônica + fase reversa), que podem ser escolhidos para fazer a separação de acordo com o comportamento do analito e constituição da matriz [51]. O emprego desses sorventes em SPE se deu junto com o desenvolvimento de colunas para HPLC. Por isso, convencionalmente são usadas partículas de sílica e sílica modificada, mas começaram a ser encontradas novas classes de sorventes em SPE, como polímeros molecularmente impressos (*Molecularly imprinted polymers*, MIP), imunossorventes e resinas quelantes, conforme esses materiais foram desenvolvidos na cromatografia [50, 53]. O formato dos sorventes também é importante, pois para o acoplamento on-line o extrator deve estar em formato de coluna, discos ou pequenos cartuchos de extração como filtros de seringa. Em diferentes abordagens (off-line), o sorvente pode ser preparado em forma de barra de agitação magnética [54].

Como mencionando no parágrafo anterior, SPE é realizada em suportes sólidos baseados em sílica ou polímeros. Assim como na cromatografia, cada suporte apresenta suas próprias vantagens e desvantagens. Os suportes baseados em sílica modificada têm grupos silanois residuais que são atacados por solventes polares, o que limita o uso em pHs extremos, e interações secundárias criam dificuldades para eluição de analitos, especialmente compostos básicos. Partículas de sílica podem ser usadas para SPE, mas monolitos de sílica também são usados, assim como em HPLC. Sorventes baseados em polímeros não têm limitações no pH, o que aumenta a flexibilidade de sua formulação e desenvolvimento do método de extração, entretanto podem ter um notado efeito de variação de volume ao serem expostos a solventes orgânicos.

Os sorventes modernos para SPE, com mecanismos de reconhecimento molecular, como MIPs, imunosorventes e resinas quelantes, capazes de alta seletividade de extração são em sua maioria baseadas em polímeros devido à facilidade de reação e ajuste da porosidade e da natureza química da superfície. Ao utilizar polímeros como suporte para esses sorventes é mais fácil fazer a ligação do grupo funcional às superfícies poliméricas do que modificar a sílica com esses grupos. Polímeros para SPE podem ser obtidos em forma de esferas (partículas de polímeros) que são posteriormente modificados (ou então já contém a função após a polimerização) e empacotados em colunas ou cartuchos. Também podem ser sintetizados em forma de colunas monolíticas porosas, que são preparados *in situ* diretamente no molde do dispositivo adaptado para SPE, como colunas, cartuchos ou ponteiros de pipeta. Os monolitos poliméricos apresentam permeabilidade marcadamente maior do que os suportes compostos de partículas, resultado da presença de poros de fluxo, como detalhado no Capítulo 1.

2.1.4. SPE realizada com monolitos

Inicialmente o uso de monolitos como suportes de SPE ganhou popularidade devido à grande variedade de agentes químicos que podem ser utilizados no seu preparo. Eles têm algumas vantagens frente a materiais particulados mais convencionais, mas também algumas desvantagens, sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens de monolitos como suportes para SPE (adaptado da referência 53)

	Monolitos poliméricos	Outros suportes particulados
Vantagens	Ausência de volume interpartícula Fácil preparação e controle do tamanho de poro Flexível, modificado com qualquer funcionalidade Moldado em qualquer formato Robusto mecanicamente Rápida transferência de massa sob condições dinâmicas Baixa pressão	Alta área superficial Pequeno tamanho de partícula Dimensões diversas da coluna
Desvantagens	Baixa área superficial Dimensões estreitas da coluna Fornecimento comercial limitado	Caminhos preferenciais Necessidades de filtros retentores Alta pressão

Área superficial é um dos fatores mais importantes para extrair o analito da amostra por SPE. A área superficial de monolitos poliméricos é tipicamente baixa devido à presença de macroporos e baixa quantidade de mesoporos, o que acaba por limitar a capacidade de extração quando os mesmos são empregados em SPE. Enquanto áreas superficiais de até $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ são encontradas em partículas de polímeros, monolitos poliméricos apresentam área superficial baixa ($<100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [55]. Ao se comparar com monolitos baseados em sílica ($300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), os monolitos poliméricos também têm área baixa [53]. Apesar de ter menor área superficial do que monolitos feitos de sílica, monolitos poliméricos podem ter a superfície química mais adequada para interação favorável com o analito devido à grande quantidade de monômeros que podem ser usados na polimerização. Além disso, monolitos poliméricos são compatíveis com biomoléculas [53].

Ao usar um suporte sólido com alta permeabilidade, assim como são colunas monolíticas poliméricas, a vazão máxima trabalhável é relativamente alta, o que permite o processamento de grandes volumes de amostra por unidade de tempo. Outra vantagem é a possibilidade de adotar estratégias no sentido de tentar otimizar a estrutura do monolito para modular a área superficial e conseqüentemente a capacidade de extração. Enquanto uma alta área superficial em monolitos é sempre desejada, a tolerância a vazões altas e a habilidade de analisar amostras de matrizes “suja” também é desejada [56]. Se o sistema de propulsão não tiver potência suficiente, esse pode ser o fator determinante na formulação do monolito, pois o monolito deve priorizar a permeabilidade sobre a capacidade de extração, já que não vai ser de nenhum benefício um monolito com alta área superficial que não permite a passagem de solução de amostra. Esse pode ser o caso de sistemas de análise em fluxo, que utilizam bombas de

pistão de vidro e bombas peristálticas que trabalham com pressões muito menores do que bombas de sistemas de HPLC.

Os sorventes com mecanismos de reconhecimento molecular foram desenvolvidos para melhorar a seletividade de procedimentos de SPE, devido à falta de seletividade de sorventes convencionais polares ou hidrofóbicos que podem co-adsorver e co-eluir compostos interferentes de matrizes complexas junto com o analito.

As interações altamente específicas entre anticorpo e analito alvo antígeno foram usadas para desenvolver imunossorventes úteis para SPE em amostras ambientais e biológicas. Imunossorventes exibem alta seletividade e afinidade e podem ser aplicados para muitos antígenos. Um suporte bastante utilizado para imunossorventes são colunas monolíticas baseadas em poli(GMA-co-EDMA), em que é explorada a reatividade do grupo epóxi do monolito proveniente do grupo glicidil para imobilizar o anticorpo que vai ter interação específica com o analito alvo. Discos monolíticos comerciais de poli(GMA-co-EDMA) chamados de Convective Interaction Media (CIM®) também foram usados para esse fim. [18]

MIPs, também conhecidos como anticorpos artificiais, são polímeros altamente reticulados, formados na presença da molécula alvo ou um molde de estrutura análoga. Após a polimerização o molde é removido, o que produz uma cavidade com sítios de reconhecimento molecular que pode se ligar seletivamente à molécula original. Por isso são altamente seletivos para capturar o analito alvo, assim como faz um anticorpo. Inicialmente esses sorventes eram preparados em vials de vidro que eram quebrados e o polímero desintegrado, peneirado e depois empacotado numa coluna. Esse processo é demorado e consome grandes quantidades da molécula molde, além do mais resulta em partículas com distribuição muito heterogênea de tamanho e de forma. Por isso tais MIPs têm alta seletividade, mas baixa performance cromatográfica. Para melhorar a

performance cromatográfica, MIPs foram produzidos como partículas esféricas numa polimerização por suspensão ou como monolitos macroporosos. MIPs em formato de monolitos têm a vantagem de fácil preparação nas dimensões do tubo cromatográfico, alta homogeneidade da fase estacionária, levando a baixa dispersão devidos a caminhos múltiplos e elevada permeabilidade, além de significativa economia da molécula molde, já que todo o polímero é usado [18]. Como nesse caso o monolito contém as cavidades, o próprio monolito é o sorvente, diferente das aplicações em que ele é usado como suporte do sorvente.

A modificação química da superfície de colunas poliméricas poli(GMA-co-EDMA) e discos CIM® com grupos quelantes é explorada para extração seletiva de metais através da formação de complexos de superfície. Para essa abordagem uma grande quantidade de ligantes bem caracterizados são disponíveis comercialmente para a modificação do polímero, como ácido iminodiacético (IDA), ácido piridinocarboxílico, ácido 2,6 – piridino dicarboxílico, etileno diamina (EDA), 8-hidroxiquinolina (8-HQ), e cisteína (Figura 13). Comumente os quelantes para complexação de metais de transição possuem grupos funcionais de ácido carboxílico, uma vez que esses grupos apresentam cinética de complexação favorável e seletividade para metais de transição em preferência à metais alcalinos ou alcalinos terrosos e elevada reversibilidade mediante alterações de pH [58].

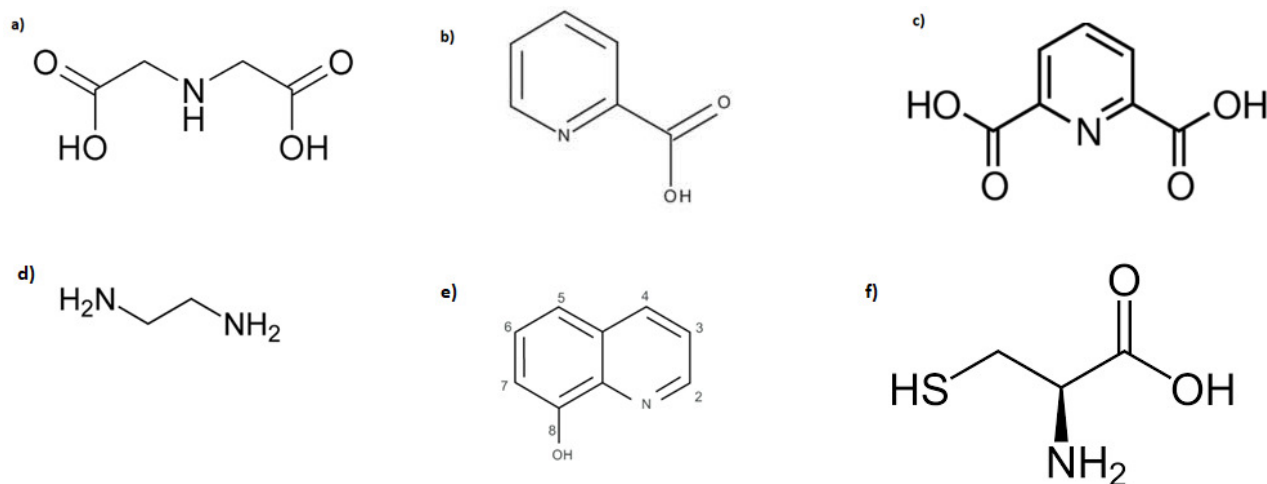


Figura 13: Exemplos de ligantes quelantes imobilizados em monolitos poliméricos. a) ácido iminodiacético (IDA); b) ácido piridinocarboxílico; c) ácido 2,6 – piridino dicarboxílico; d) etileno diamina (EDA); e) 8-hidroxiquinolina (8-HQ); f) cisteína [57, 58]

Ao serem incorporados na superfície do monolito altamente reticulado os grupos quelantes ficam menos propensos a variações de volume devido à mudança no pH, um problema relatado para a resina Chelex-100 [89], uma resina baseada em IDA, obtida com a substituição do hidrogênio ligado ao nitrogênio por um átomo de carbono.

A combinação de características de alta permeabilidade, área superficial elevada, estrutura rígida, ausência de espaços interpartículas e canais preferenciais em monolitos poliméricos significa que colunas muito curtas ou discos podem ser preparados e incorporados em sistemas de baixa pressão, tais como os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA). Desde o surgimento comercial dos discos monolíticos CIM® da BIA Separations em 1998, muitas metodologias de preparo de amostra e extração em fase sólida em sistema FIA usando tais dispositivos começaram a aparecer [58].

2.1.5. Acoplamentos da SPE com métodos de análise em fluxo

Uma metodologia ideal de tratamento de amostra deve envolver o menor número possível de etapas e ser ambientalmente correta. Devido ao aumento do número de

amostras, é necessário haver uma alta frequência amostral com técnicas analíticas totalmente automatizadas. A automação do preparo de amostra por SPE é de grande importância para maximizar a frequência de amostragem e minimizar os custos, tempo e risco de exposição do analista à agentes químicos nocivos já que o processo todo da SPE on-line acontece em sistema fechado. Além disso, elimina etapas que são potenciais fontes de erros, como evaporação e reconstituição. Nesse contexto, o design apropriado dos dispositivos de extração e a facilidade dos procedimentos torna conveniente e rápida a implementação do acoplamento on-line da SPE com a etapa de quantificação. Técnicas de análise em fluxo podem tornar isso possível. O acoplamento de módulos de análise em fluxo ou similares é feito através de instrumentação como tubos, conexões, válvulas de injeção e bombas de propulsão para fazer a comunicação entre os componentes do sistema (coluna, detector e soluções) e fazer a passagem das soluções pela coluna durante as etapas de carregamento, lavagem, eluição e condicionamento. As vantagens que métodos de análise em fluxo podem agregar à SPE são a redução da quantidade de solventes, alta frequência de amostragem e mínimo de interferência humana, já que as operações de sistemas em fluxo podem ser controladas por computador através de programação prévia. Recentemente (2018) Rocha et al. revisaram aplicações e características principais da integração da análise em fluxo com SPE [52].

Métodos de análise em fluxo surgiram com a proposta inicial de que a análise química feita em via úmida poderia ser realizada em fluxo de amostras e reagentes em vez de somente batelada. A Análise por Injeção Sequencial (SIA) é chamada de segunda geração dos métodos em fluxo, e é uma técnica totalmente controlada através de programação, apresentando baixo consumo de amostra e reagente, devido ao fluxo ser descontínuo e programado, além de ser robusta devido à simplicidade mecânica e

automatização das manipulações amostrais, que ocorrem em um único canal, e por isso é estável por longos períodos e precisa de pouca manutenção. A Figura 14 mostra um exemplo de sistema SIA configurado para auxiliar um procedimento de SPE.

SIA é uma técnica versátil, cujo instrumento conta com uma válvula rotatória multiportas onde são conectadas diferentes soluções e também pode ser conectada a coluna de extração, para fazer uma SPE com alta precisão instrumental. As reconfigurações do sistema para diferentes análises são feitas sem dificuldade com pouca alteração dos componentes. Durante a análise, volumes pré-determinados de amostra, solução eluente ou solução de recondicionamento conectados na válvula rotatória são aspirados para o interior de uma bobina coletora que fica entre a válvula rotatória e a bomba de seringa, e, com a reversão da direção do fluxo, as soluções são transportadas em direção à coluna fazendo assim as etapas de carregamento, eluição ou recondicionamento da coluna de SPE. Para a movimentação bidirecional do fluxo, comumente se utilizam bombas de seringa, que são robustas e aspiram e injetam volumes bem definidos em vazões precisas com baixa pulsação. Essas bombas são de média a baixa pressão, que tem pressão máxima em torno de 50 psi, e podem fazer a percolação de solução por colunas com elevada permeabilidade, mas não por colunas de baixa permeabilidade, como as empacotadas com partículas muito pequenas tipicamente usadas em HPLC ($< 5 \mu\text{m}$). No início do ciclo de adsorção, para que haja volume de trabalho na seringa, é aspirado um volume de solução transportadora (na posição “IN” da Figura 14), que também serve como solução de lavagem da coluna após o carregamento de amostra, quando a bomba retorna à posição inicial. Então as etapas de carregamento de amostra e lavagem da coluna ocorrem em conjunto (sequencialmente), o que torna o procedimento de SPE mais simples [52]. Toda operação é controlada por

computador que contenha um programa específico para SIA, que comanda as bombas e válvulas de modo sincronizado.

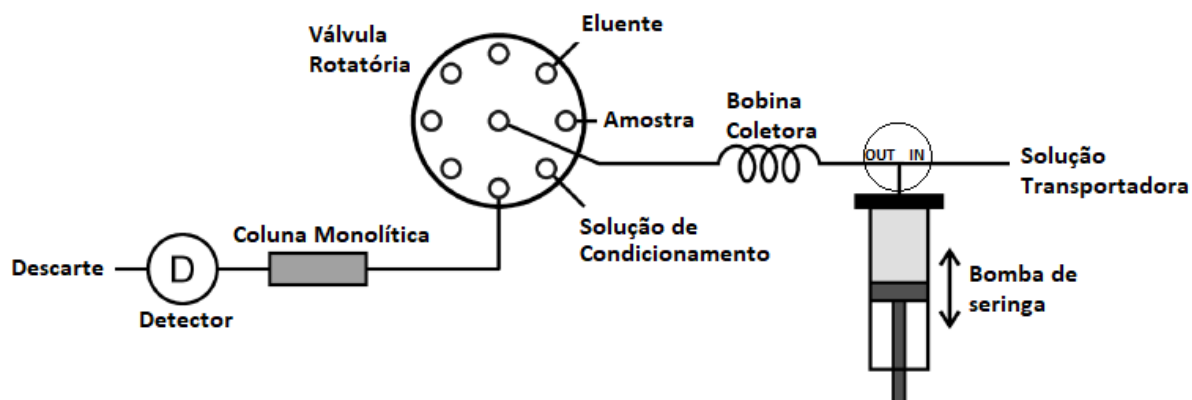


Figura 14: Exemplo de um sistema de SIA configurado para SPE [52]

Além do uso com SPE, o SIA é considerado uma ferramenta poderosa para tratamento de amostra em geral, porque diferentes tipos de tratamentos podem ser feitos pelo acoplamento de variadas unidades na válvula rotacional (reservatórios, detectores, bombas, reatores, separadores, células e outros dispositivos) juntamente com as soluções requeridas na análise. A característica do fluxo bidirecional e descontínuo pode ser explorada para manipular a amostra de diferentes maneiras, com reversões de fluxo e paradas de fluxo. A programação do fluxo diminui a imprecisão dos procedimentos. Entre os tratamentos possíveis, um dos mais facilmente feitos pelo SIA é a diluição on-line de um único padrão (evitando o preparo de vários padrões) e amostras (para trazer a concentração da amostra dentro da faixa trabalhável no caso da amostra ser muito concentrada). A diluição pode ser feita com a dispersão da amostra ou padrão enquanto ela se movimenta pelo sistema, explorando o conceito de reamostragem de zona, ou em alguma câmara de mistura adicional dedicada à diluição [92, 59, 112].

O acoplamento da SIA com métodos de separação é motivado pelo fato de que, como outros métodos baseados em fluxo, o SIA clássico não tem a habilidade de fazer separações e determinações de multi-componentes sem tratamento prévio para remover

as matrizes interferentes, apesar de ser uma técnica com o arranjo experimental bastante flexível e que tem as condições hidrodinâmicas controladas com alta eficiência [60]. Por outro lado, HPLC e SPE são focadas na separação de um grupo de analitos ou da matriz da amostra, mas usam instrumentação cara e sofisticada. Na tentativa de baratear os custos e simplificar a instrumentação de HPLC e ao mesmo tempo prover capacidade de separação ao SIA, foi criado em 2003 uma nova técnica de separação totalmente automatizada chamada Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) [60]. O SIC utiliza a instrumentação típica de SIA para automatizar a cromatografia, e devido ao fluxo bidirecional e descontínuo o método tem uma drástica redução no consumo de fase móvel e baixa geração de resíduos em comparação com métodos em que a fase móvel é constantemente bombeada pela coluna e em consequência os custos de operação são baixos. O arranjo experimental do SIC é similar ao apresentado na Figura 14, com a diferença que na válvula rotacional são conectadas fases móveis adicionais (soluções eluentes) que podem ajudar na eluição seletiva dos analitos. Esse tipo de acoplamento só pôde ser feito com colunas monolíticas, pois essas têm maior permeabilidade do que colunas convencionais de HPLC, resultando em pressões muito mais baixas, compatíveis com as bombas de seringa do SIA [60]. Mais recentemente (2011), aperfeiçoamentos nos equipamentos de SIC, incorporando bombas de pistão com capacidade para pressões de até 1000 psi permitiram o uso de colunas empacotadas com partículas core-shell [113]. Essas partículas são constituídas por um núcleo impermeável recoberto por uma fina camada da fase estacionária. Tal conformação resulta em alta eficiência de separação devido à rápida difusão dos analitos que se estabelece na fase estacionária, diminuindo a contribuição do termo C da equação de van Deemter. Além disso, colunas empacotadas com partículas core-shell geram pressão muito menor do que as colunas (de mesmo diâmetro e comprimento) empacotadas com

partículas totalmente porosas de mesmo diâmetro [61, 52]. Mesmo assim, colunas monolíticas são mais apropriadas aos sistemas SIC, pois permitem análises mais rápidas (maiores vazões) sem perda de eficiência, como demonstrado por Urio e Masini para separação de herbicidas triazínicos usando colunas monolíticas e core-shell [114].

O fluxo bidirecional e descontínuo característico do SIA é usado para aspirar e injetar volume bem definido de uma suspensão de partículas esféricas com propriedades adsorventes e formar colunas renováveis e bastante reprodutíveis em cada ciclo de SPE, numa abordagem chamada de SPE por injeção de esferas, ou do termo em inglês, *Bead Injection - Solid Phase Extraction* (BI-SPE). As esferas são partículas poliméricas de variadas origens (Sephadex, Agarose, etc., com diâmetro variando de 50 a 200 μm) contendo grupos funcionais de diferentes naturezas químicas [67]. As esferas em suspensão são mantidas em agitação e são acessadas por uma porta da válvula rotacional, sendo aspiradas e depois injetadas pelo SIA em uma célula especialmente desenhada para reter as esferas, formando uma microcoluna, deixando passar a solução (essa célula foi chamada de “*jet-ring cell*” pelos autores [62]). Em seguida é injetada a amostra nessa coluna para efetuar a SPE. Após a medida as esferas são descartadas (aspiradas de volta para bobina coletora e então injetadas no descarte). Análises sequenciais são feitas injetando novas esferas na célula, assim formando uma nova coluna a cada medida. A Figura 15 ilustra o processo de empacotamento feito com o fluxo do SIA e a representação do sistema. A detecção desse sistema foi feita por fluorescência perpendicularmente à célula [62].

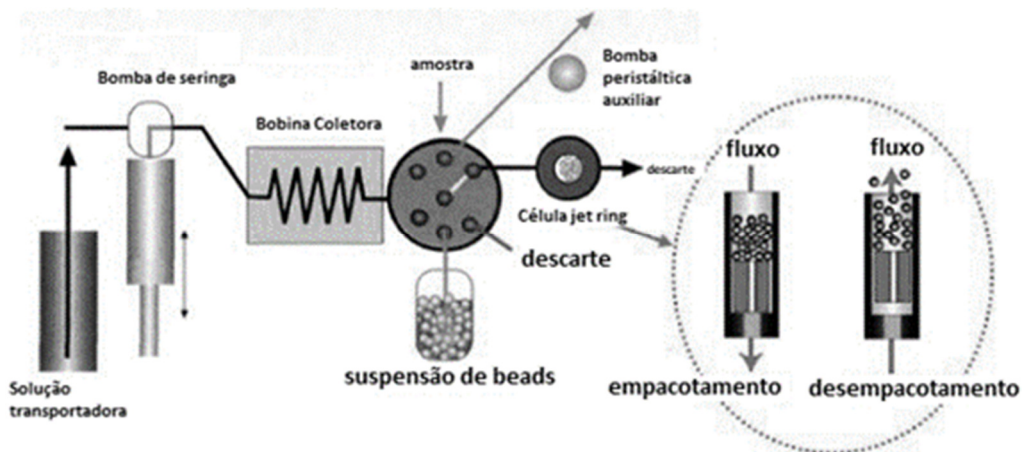


Figura 15: Representação de um sistema de SIA modificado para BI-SPE e detalhe da coluna sendo empacotada e desempacotada com a reversão de fluxo do SIA [62]

Com a BI-SPE a fase sólida é renovada antes de cada etapa de carregamento, evitando problemas de contaminação, caminhos preferenciais, e retenção irreversível de analitos, que podem ocorrer em colunas fixas [59]. Já as colunas fixas uma vez constituídas podem ser usadas muitas vezes antes de começar a apresentar esses problemas. A BI-SPE é comparável com a SPE feita com monolitos poliméricos porque ambas têm colunas de baixa pressão e que são comumente acopladas ao SIA para uma extração de alta precisão. Cada uma tem suas vantagens e desvantagens. A extração com coluna monolítica não consome a fase estacionária (esferas) e o procedimento é mais simples, mas o efeito de memória, entupimento e perda de sítios ativos, resultado do uso repetitivo do sorvente, pode ser maior, enquanto a BI-SPE elimina o efeito de memória, mas deixa o procedimento mais complicado e demorado. Apesar das colunas monolíticas poliméricas não serem renovadas em cada ciclo de SPE, estudos sobre a durabilidade das mesmas não apontaram problema nesse sentido. Por exemplo, colunas de poli(BMA-co-EDMA) não apresentaram variação significativa nos tempos de retenção ou pressão da coluna mesmo após 2200 separações consecutivas de três proteínas, numa mistura teste constituída de Ribonuclease A, Citocromo c e Mioglobina [63]. Num estudo similar, a durabilidade de uma coluna de poli(estireno-co-vinilbenzil

cloreto-co-divinilbenzeno) após grafting térmico de hidróxido de [2-(metacrililoiloxi)etil] dimetil(3-sulfopropil) amônio foi demonstrada e, após 10000 injeções, a coluna não perdeu a capacidade de separação de fenol, tolueno e tiouréia, e os desvios padrões dos tempos de retenção foram de 2 e 3,5% e o desvio padrão da pressão da coluna foi de 2,5% [64]. Colunas monolíticas poliméricas propostas no início dos anos de 1990 já tiveram suas propriedades exploradas a fundo, inclusive a durabilidade e estabilidade, e elas se mostraram ser bastante estáveis e robustas, com alta repetibilidade coluna-a-coluna e corrida-a-corrída [64].

Outra abordagem moderna de SIA-SPE é feita com auxílio de um micro conduíte integrado chamado *Lab-on-Valve* (LOV). O conduíte é vendido como peça suplementar do sistema SIA para modificar o topo da válvula rotatória de 6 portas. O conceito do *Lab-on-Valve* é a diminuição da escala do canal de processamento de amostra para diminuir os volumes de amostra e reagentes (na escala de poucos microlitros, mas com possibilidade de diminuir a nanolitros) para diminuir a geração de resíduos, e também ser uma plataforma para realizar qualquer etapa da análise, como diluição, adição de reagente, mistura, incubação, separação e detecção, idealmente, em qualquer sequência, por isso sendo chamado de “laboratório na válvula” [66]. Tais procedimentos não seriam possíveis de realizar em um fluxo contínuo e unidirecional, por isso o método é assistido por SIA. O procedimento da SPE-LOV é similar à SPE por injeção de partículas do adsorvente (esferas), mas a coluna renovável é constituída dentro do conduíte de LOV, em locais do dispositivo em que as partículas podem ser injetadas, retidas, e descartadas após o uso. A Figura 16 mostra a foto de uma válvula rotatória modificada com o LOV com as linhas contornando o conduíte e a representação de como a válvula pode ser preenchida com partículas para realizar espectroscopia em fase sólida (SPS, do inglês *Solid Phase Spectroscopy*), em que a

medição espectrométrica é feita diretamente nas partículas (Fig 16 a), e a SPE, em que as partículas são aprisionadas e depois percoladas pela solução da amostra e depois pelo eluente (Fig 16 b), com um princípio análogo à uma SPE clássica. Nesse caso o eluato é monitorado espectroscopicamente em fluxo ao passar pelo caminho de detecção óptica.

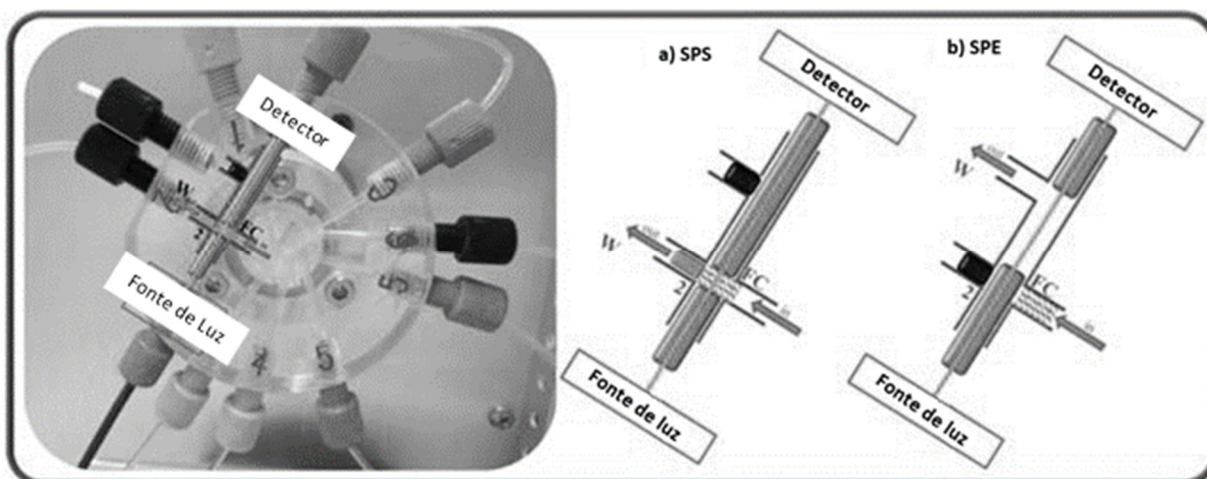


Figura 16: Fotografia de uma válvula rotatória modificada com o LOV, com as linhas azuis contornando a válvula. a) SPS: As partículas são aprisionadas na válvula, entre duas fibras ópticas; (b) SPE: As partículas são aprisionadas antes do percurso óptico do detector espectrofotométrico, e as fibras ópticas monitoram a absorbância do eluato após seguir o fluxo pela célula [67]

Assim como na BI-SPE, as colunas são renováveis e têm efeito de memória eliminado. A versatilidade é grande pela quantidade de ensaios que podem ser feitos, e a baixa geração de resíduo pode ser um grande diferencial dessa abordagem em comparação com métodos de colunas fixas, ainda mais se o canal for diminuído ao volume de nanolitros. Entretanto, o uso de canais muito estreitos dificulta a aplicação em amostras reais, pelo possível entupimento ou contaminação dos mesmos, o que também dificulta a lavagem do dispositivo após a análise. Além do mais a diminuição dos volumes de amostra e reagente utilizados em cada ensaio pode ser exagerada, já que na realidade o próprio volume do conduto que comunica o recipiente da amostra até a válvula rotacional já tem um volume de alguns microlitros, e a lavagem desse canal

antes da injeção de amostras com diferentes concentrações consumiria mais amostra do que a análise [66]. De acordo com o autor, enquanto alguns ensaios necessitam diminuição de escala (como na espectrometria de massa como ionização por *electrospray*) a diminuição de escala da maioria dos ensaios baseados em reações, abaixo do nível de μL , parece criar mais dificuldades do que benefícios [66]. Ao se trabalhar na escala do SIA tradicional a geração de resíduos pode ser maior, mas o sistema é menos propenso a entupimentos com análise de amostras reais. Os custos também ficam mais baixos, já que o *Lab-on-valve* é fornecido exclusivamente pela empresa FIALab a um preço elevado.

2.1.6. Detecção de metais por métodos eletroquímicos

Métodos eletroquímicos de análise podem ser aplicados para determinação quantitativa e qualitativa de íons metálicos eletroativos em solução. Os métodos são divididos em potenciométricos, coulométricos, condutométricos e voltamétricos. Dentre as técnicas eletroquímicas disponíveis para quantificação de metais estão Voltametria de Redissolução Anódica (*Anodic Stripping Voltametry, ASV*) e Cronopotenciometria de Redissolução (*Stripping Chronopotenciometry, SCP*), que são duas técnicas de redissolução. Essas técnicas ocorrem em duas etapas, sendo a primeira uma etapa de deposição que envolve a aplicação de um potencial constante suficientemente negativo por um tempo fixo para a deposição eletrolítica dos metais sobre a superfície do eletrodo de trabalho (usualmente de mercúrio), com o objetivo de concentrá-los. A próxima etapa é a de medição, em que é feita a reoxidação do metal acumulado na superfície do eletrodo. Na ASV, a reoxidação é feita com a varredura do potencial na direção positiva com diferentes formas de variação de potencial (pulsos diferenciais, onda quadrada), enquanto na SCP a reoxidação é feita por um oxidante químico ou pela

aplicação de uma corrente oxidante constante ao eletrodo de trabalho. O sinal analítico na ASV é a corrente de pico que surge no potencial em que o metal é reoxidado de volta à solução. Em cronopotenciometria, o sinal analítico é o tempo de transição requerido para a reoxidação, ou o tempo de transição necessário para a mudança entre dois patamares de potencial (que ocorre no potencial de oxidação do metal) [68, 69]. Ao aplicar a derivada temporal inversa na curva potencial vs. tempo do processo obtém-se o gráfico dt/dE vs. E (Figura 17 b), cuja integral fornece tempo de transição. Na Figura 17 está a comparação do modo de alteração do potencial e obtenção do sinal das suas técnicas.

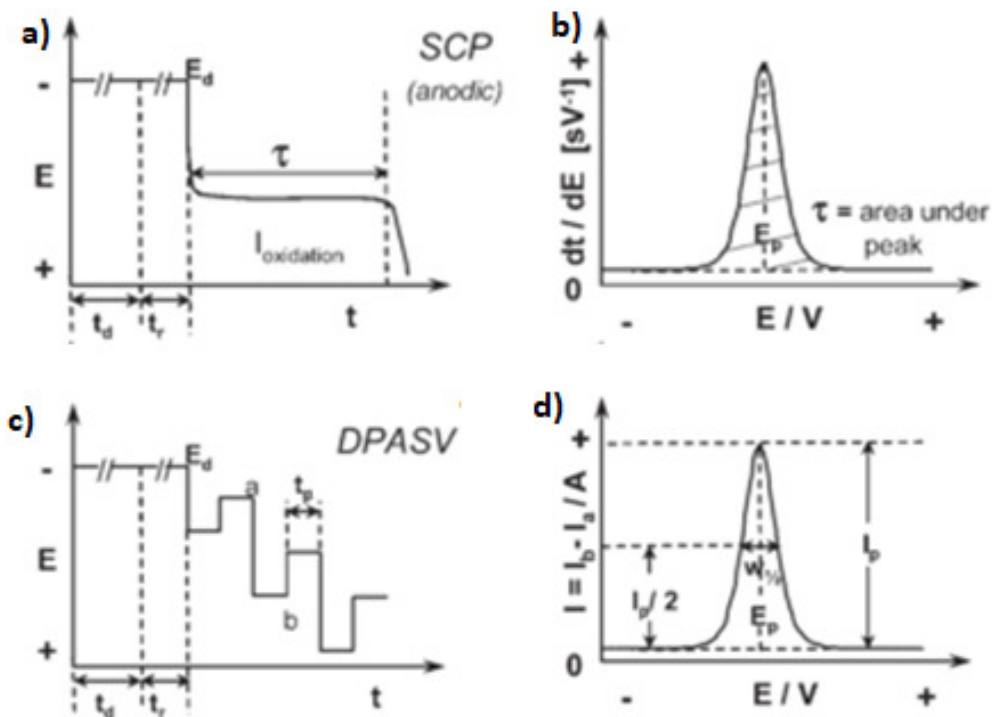


Figura 17: Comparação do modo de alteração de potencial em (a) Stripping Cronopotenciométrico – SCP, em que é aplicada uma corrente de oxidação até que o potencial altere entre dois patamares (b) gráfico dt/dE vs. E onde é medida a área do pico para obter o tempo de transição (c) Voltametria por Redissolução Anódica com pulso diferencial – DPASV, em que é variado no sentido positivo por pulso diferencial (d) pico de corrente obtido na redissolução da ASV. Adaptado de [68]

Sob condições constantes de agitação na etapa de deposição, posicionamento de eletrodo e uso de eletrólito suporte para garantir o transporte das espécies por difusão e

convecção o sinal obtido na etapa de redissolução geralmente é proporcional à concentração do metal acumulado a partir da solução (livre + lábil). O potencial em que os picos aparecem são característicos de cada metal e é relacionado ao potencial redox padrão do metal, podendo ser usado para identificação qualitativa.

Apesar da ASV ser a mais difundida, a SCP tem algumas vantagens sobre ela. A reoxidação do metal depositado na superfície do eletrodo pode ser incompleta na ASV, o que pode ocasionar um grande efeito de memória entre uma medida e outra. Adicionalmente, interferências adsorptivas podem afetar a altura e o formato do pico voltamétrico em consequência da corrente capacitiva que surge do fenômeno de adsorção [69]. Por outro lado, na SCP o sinal reflete o tempo necessário para a corrente constante alterar o potencial do ponto em que o metal começa a se oxidar, que é o momento em que o potencial começa a variar, até o ponto em que o todo o metal se oxidou (depleção completa), que é o momento em que o valor de potencial chega no estado estacionário. Por isso o metal pré-depositado no eletrodo é reoxidado até a exaustão, o que evita que uma análise comece com metal pré-depositado no eletrodo e evita o efeito de memória no eletrodo que pode ocorrer com a ASV. Isso também faz com que a SCP tenha um sinal independente do alargamento de pico que ocorre em função da heterogeneidade de complexos envolvendo ligantes polieletrólíticos/ou adsorção de matéria orgânica na superfície do eletrodo, já que o sinal medido é o tempo de reoxidação completo. Como consequência SCP tem sido bastante aplicada na determinação de metais em amostras ambientais, fluidos biológicos e tipos diversos de suspensão coloidal [68, 70].

A SCP, por ser um método de redissolução, quando acoplada com o eletrodo correto e sistema de fluxo correto, pode apresentar um dos menores limites de detecção disponíveis para metais, frequentemente tão baixo quanto poucos nmol L^{-1} [49]. A

sensibilidade de métodos de redissolução é atribuída à etapa de deposição, que pode demorar de poucos segundos até 30 minutos de acordo com o nível de concentração que se deseja determinar. Os metais mensuráveis em concentrações traço por SCP são basicamente os que formam amálgama com o mercúrio, entre eles cádmio, chumbo, cobre, zinco, bismuto, gálio, níquel, estanho, muitos dos quais são tóxicos e têm interesse ambiental.

Métodos de cronopotenciometria de redissolução usualmente são automatizados com métodos de análise em fluxo, permitindo a troca de meio automatizada e monitoramento contínuo de cátions metálicos em águas naturais. O SIA é bastante sinérgico com métodos eletroquímicos que têm uma etapa de pré-concentração antes da etapa de medição, já que a pré-concentração pode durar o tempo que for necessário para o nível de concentração que se deseja alcançar, enquanto o SIA executa simultaneamente a reversão de fluxo da zona de amostra sobre o eletrodo de trabalho [92]. Além disso a alta reprodutibilidade de tempo e condições de mistura levam a alta reprodutibilidade do transporte de massa do interior da solução para a superfície do eletrodo, o que aumenta a precisão das medidas em comparação com métodos em batelada.

A SCP sofre menos interferência de matéria orgânica depositada sobre o eletrodo no momento de aquisição de sinal [71]. Por isso a maioria das aplicações de SCP foram desenvolvidas para a análise de compostos inorgânicos em amostras ricas em matéria orgânica, enquanto aplicações para determinar compostos orgânicos são raras [68]. Entretanto a matéria orgânica pode interferir de outras maneiras como na maioria dos métodos eletroquímicos. A matéria orgânica ao se depositar sobre o eletrodo de trabalho pode obstruir o mesmo, tornando-o inacessível para o metal em solução na etapa de deposição. Também pode aprisionar metais em solução quando os

ligantes orgânicos naturais formam ligações muito estáveis com os mesmos, formando complexos inertes, que deixam os metais inacessíveis ao eletrodo de trabalho, dificultando a determinação da concentração total. A presença de grande quantidade de matéria orgânica também pode alterar propriedades da solução, como viscosidade, o que altera os coeficientes de difusão dos metais e conseqüentemente o sinal.

A sobreposição dos picos causa problemas na determinação simultânea de metais com similaridades nos potenciais de oxidação, por ser mais difícil fazer a leitura do pico. A formação de intermetálicos também pode interferir, o que ocorre quando dois metais que têm tendência a se ligarem entre si se depositam simultaneamente sobre o eletrodo de trabalho, dificultando a análise individual de cada metal. Para contornar a formação de intermetálico pode ser usado um modificador químico (ou interferente químico), que seria um terceiro elemento que se ligue preferencialmente a um dos metais ou diminuir o potencial para que um dos íons não se deposite [71].

2.1.7. Sensores Impressos

A SCP pode ser usada com sensores impressos, que são basicamente a miniaturização de uma célula eletroquímica feita com a deposição de filmes dos materiais eletroativos sobre uma superfície inerte, geralmente de PVC, sendo coberto por uma segunda camada de um isolante para definir a área de contato elétrico numa extremidade e outra para ser a superfície do eletrodo [72]. Esses eletrodos são preparados previamente em laboratório, facilitando o uso deles em campo. Sensores impressos de filme de mercúrio, ouro e grafite são atualmente disponíveis comercialmente.

Os sensores impressos propostos por Palchetti et al. [73] são feitos primeiramente com a aplicação de uma tinta de prata para formar as partes condutivas

(que depois são cobertas com tintas isolantes) e também um eletrodo pseudo-referência de prata. Depois são pintados o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo pela aplicação de uma camada de tinta de grafite. Para obter o sensor final o eletrodo de trabalho de grafite é modificado com solução de mercúrio (II). O eletrodo de trabalho é então recoberto com uma camada de Methocel[®] (metil-celulose), um material polimérico que ajuda enclausurar o filme de mercúrio e aumentar a robustez pela estabilidade mecânica. O eletrodo de pseudo-referência de prata serve como referência para o potencial aplicado pelo potenciostato ao formar uma meia célula com o Cl⁻ em solução, formando um eletrodo de referência de Ag⁰/AgCl. Para esse eletrodo ter potencial constante o AgCl depositado precisa estar em equilíbrio com o Cl⁻ em solução, por isso é necessário que o eletrodo esteja em contato de concentração constante de Cl⁻.

2.2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método de extração em fase sólida (SPE) de Cd, Cu e Pb online com detecção por cronopotenciometria de redissolução, com o auxílio de um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para automatizar as etapas de carregamento de amostra, eluição de analito, lavagem e acondicionamento do sorvente, utilizando como suporte sólido colunas monolíticas porosas complexantes, compostas do polímero poli(GMA-co-EDMA) modificadas com o grupo quelante ácido iminodiacético (IDA). Para isso foi necessário chegar a um monolito com alta permeabilidade para ser acoplado em um sistema de baixa pressão, o que foi feito com o ajuste preciso da mistura reacional e das condições de polimerização. Com o monolito complexante obtido e caracterizado, foi desenvolvido o método de SPE avaliando a influência dos parâmetros importantes para realizar o procedimento e o método foi avaliado por aplicação em amostras reais.

2.3. PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Reagentes e soluções

Glicidil metacrilato (GMA) e etileno dimetacrilato (EDMA) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), e purificados em uma coluna de óxido de alumínio ativado para remover inibidores de polimerização. Azobisisobutironitrila (AIBN), 3- (trimetoxisilil) propil metacrilato (MPTS), 1-propanol, 1,4- butanediol, ácido iminodiacético (IDA), ácido 2-(*N*-morfolino) etanossulfônico (MES) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados como recebidos. Soluções padrão de Cd^{+2} , Cu^{+2} e Pb^{+2} foram preparadas em diferentes concentrações pela diluição de volumes adequados dos respectivos padrões para absorção atômica de concentração 1000 mg L^{-1} , obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Soluções de trabalho foram preparadas na presença de tampão MES $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado a 6 e NaCl $0,010 \text{ mol L}^{-1}$. A solução eluente foi constituída de Ácido Nítrico $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, preparada pela diluição de HNO_3 concentrado de grau analítico (65% vol) e do sal NaCl, ambos adquiridos da Merck. A solução de condicionamento foi composta de tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ com pH ajustado a 10, adquirido da Merck. Todas as soluções foram preparadas em água desionizada com resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida de um desionizador Simplicity 185 da Millipore (Billerica, MA, USA).

2.3.2. Equipamentos

Experimentos de Análise por Injeção Sequencial foram feitos num instrumento FIALab 3200 (FIALab Instruments, Seattle, WA, USA) representado na Figura 18. O sistema era equipado com duas bombas de seringa (BS_1 e BS_2) e suas respectivas válvulas solenoides de 3 vias (VS_1 e VS_2). A Bomba de Seringa 1 (capacidade de 2,5 mL) foi conectada a uma válvula rotatória de 8 portas (VR) por uma bobina coletora de $780 \mu\text{L}$ (BC). A Bomba de Seringa 2 (capacidade de 1,0 mL) foi conectada diretamente

a uma válvula de injeção de 6 portas e duas posições (IV) onde a coluna monolítica foi instalada (CM). A pressão máxima de trabalho da válvula de injeção e seleção é de 250 psi (17,23 bar), mas os componentes limitantes de pressão foram as bombas de seringa, que usualmente podem suportar pressões de 50 psi (3,44 bar). Conexões entre soluções e célula de fluxo e VR foram feitas por tubos de Teflon de diâmetro interno de 0,5 mm e anilhas também feitas de Teflon (Upchurch, Oak Harbor, WA). As colunas monolíticas foram sintetizadas em tubos aço inox com a parede interna revestida por sílica fundida com 2,1 mm de diâmetro interno e 3,18 mm de diâmetro externo, comprados da Sigma-Aldrich. A conexão do tubo da coluna e sistemas de fluxo foram feitas com adaptador P-702 e conexão XP-335 ambas feitas de PEEK, e anilha P-300, de ETFE, fabricadas pela IDEX Health Science (Oak Harbor, WA, USA). Uma bomba de infusão (KD Scientific, New Hope, PA, USA) foi usada para bombear solução de IDA pelo monolito de poli (GMA-co-EDMA).

Medidas eletroquímicas foram feitas com um potenciostato PalmSens (Palm Instrument BV, Houten, Holanda) usando o software PSTrace 2.4 para controle do instrumento e aquisição de dados. A célula de fluxo eletroquímica continha sensores impressos de nome comercial HM-sensor, fabricados pela Universidade de Florença, constituídos de um pseudo eletrodo de referência de Ag° , um eletrodo auxiliar de grafite e um eletrodo de trabalho de filme de mercúrio depositado sobre grafite de área 7,06 mm^2 , recoberto com um filme polimérico de éter de celulose (Methocel® 90HG) [73].

Medidas espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotômetro USB 4000 (Ocean Optics, Denedin, FL, USA) adaptado a uma cela de fluxo SMA-Z-10 μvol , com 6 μL de volume interno e caminho ótico de 1 cm, feita de PEEK, fabricada pela FIALab Instruments e uma lâmpada halógena de tungstênio LS-1-LL da Ocean Optics. Duas fibras óticas (50,8 cm) foram usadas para transmitir a radiação da fonte até a cela

de fluxo e até o espectrofotômetro. Microscopia de varredura eletrônica foi feita com um instrumento Fesem Jeol JSM-7401F (Jeol Ltda, Tokyo, Japão).

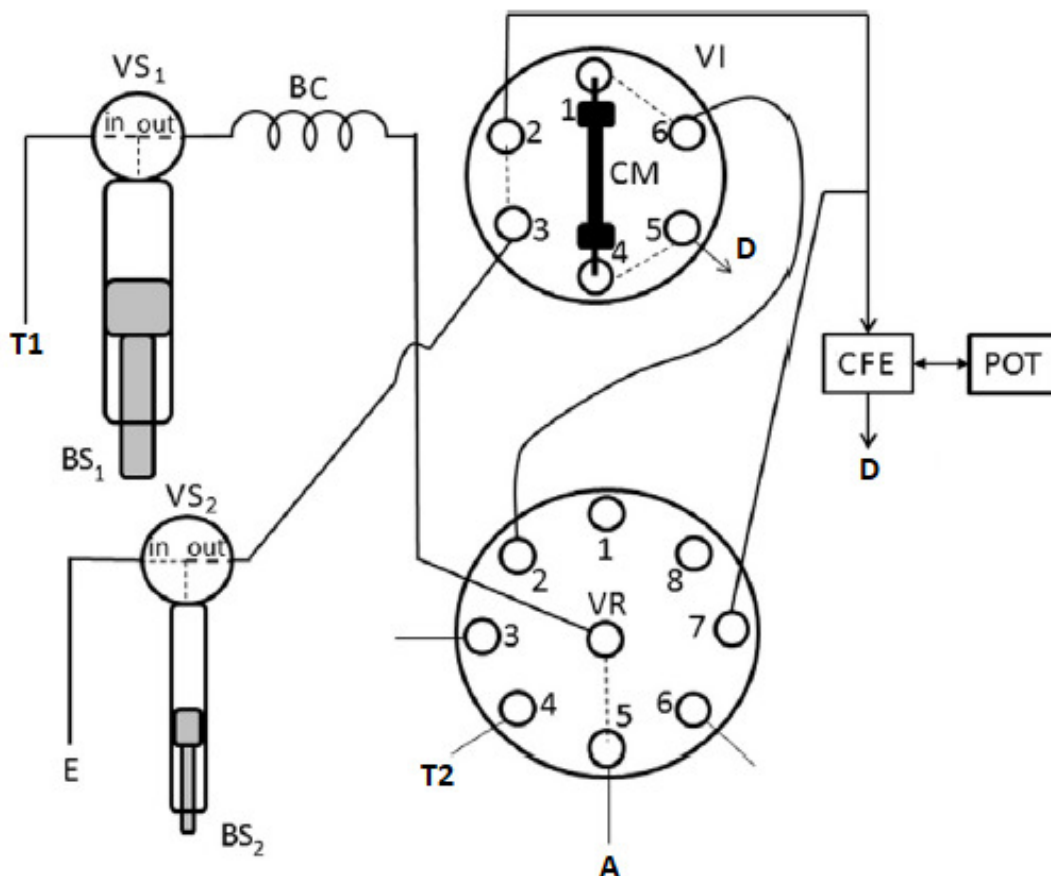


Figura 18: Analisador por injeção sequencial para SPE online (SIA-SPE). T₁ = MES 0,050 mol L⁻¹ (pH 6) em NaCl 0,010 mol L⁻¹; T₂ = NH₄OH/ NH₄Cl (pH 10); E = HNO₃ 0,50 mol L⁻¹ em NaCl 0,10 mol L⁻¹; A = amostra ou padrão; BS₁ = Bomba de seringa 1 (2,5 mL); BS₂ = Bomba de seringa 2 (1 mL); VS₁ e VS₂ = válvulas solenoides de 3 vias, com posição “in” e “out”; VR = válvula rotatória de 8 portas, na posição de amostragem; BC = bobina coletora de 780 μL; VI = válvula de injeção de 6 portas e duas posições, posição de carregamento (injeção é feita com rotação da válvula, o que conecta internamente as portas 1 e 2, 3 e 4 e 5 e 6); CM = coluna monolítica; CFE = cela de fluxo eletroquímica; POT = potenciostato; D = descarte. Linhas sólidas representam conexões externas de VS, VR e VI, e linhas pontilhadas representam as conexões internas

2.3.3. Procedimentos

2.3.3.1. Ativação da parede interna da coluna

Para ancoragem do monolito no tubo é necessário que o último seja ativado para que forme ligações covalentes com o monolito. Isso é feito com o recobrimento da parede do tubo com um grupo vinílico, que vai estar em parte ligado com o polímero e em parte ligado com o tubo. O procedimento foi similar ao descrito por Umemura et al. [74], mas com algumas modificações: para converter a maioria dos grupos siloxanos do tubo em silanois, a parede interna do tubo foi lavada com NaOH 0,2 mol L⁻¹, lavada com água deionizada, depois lavada com HCl 0,2 mol L⁻¹ e depois com água deionizada de novo. Depois foi lavada com etanol absoluto e o tubo ativado foi preenchido com solução 20 % (v/v) de 3- (trimetoxisilil) propil metacrilato em etanol (com o pH ajustado para 5) usando uma seringa, durante 1 hora. Então o tubo cheio com essa solução foi selado dos dois lados e deixado por 24 horas num forno a 60°C. Na próxima etapa ele foi lavado com acetona 3 vezes e seco com fluxo de N₂. Após isso o tubo estava pronto para receber a mistura reacional e fazer a ligação covalente dos grupos metacrilato do monolito com os do tubo.

2.3.3.2. Síntese de poli (GMA-co-EDMA)-IDA

O monolito poroso foi preparado com uma mistura de 300 mg de GMA, 100 mg de EDMA, 350 mg de 1-propanol, 200 mg de 1,4-butanodiol, 50 mg de H₂O e 4 mg de AIBN (1% em massa em relação aos monômeros) pesados num vial âmbar [75]. O vial foi fechado e a solução foi colocada em vortex por 1 minuto, sonicada por 10 minutos e borbulhada com N₂ por 10 minutos. Então, o septo foi perfurado com uma das extremidades da coluna, que foi imersa na mistura reacional. Na extremidade oposta da coluna foi encaixada uma seringa de polipropileno de 1 mL usando um pedaço de tubo Pharmed®. A mistura reacional foi cuidadosamente aspirada de modo a preencher

completamente o tubo da coluna (Figura 19, 2). O vial foi fechado, mantendo uma extremidade do tubo imersa na mistura reacional remanescente, e o sistema foi levado ao forno de um cromatógrafo a gás para polimerização por formação de radical livre iniciada termicamente com aquecimento a 60°C, por 24 horas (Figura 19, b).

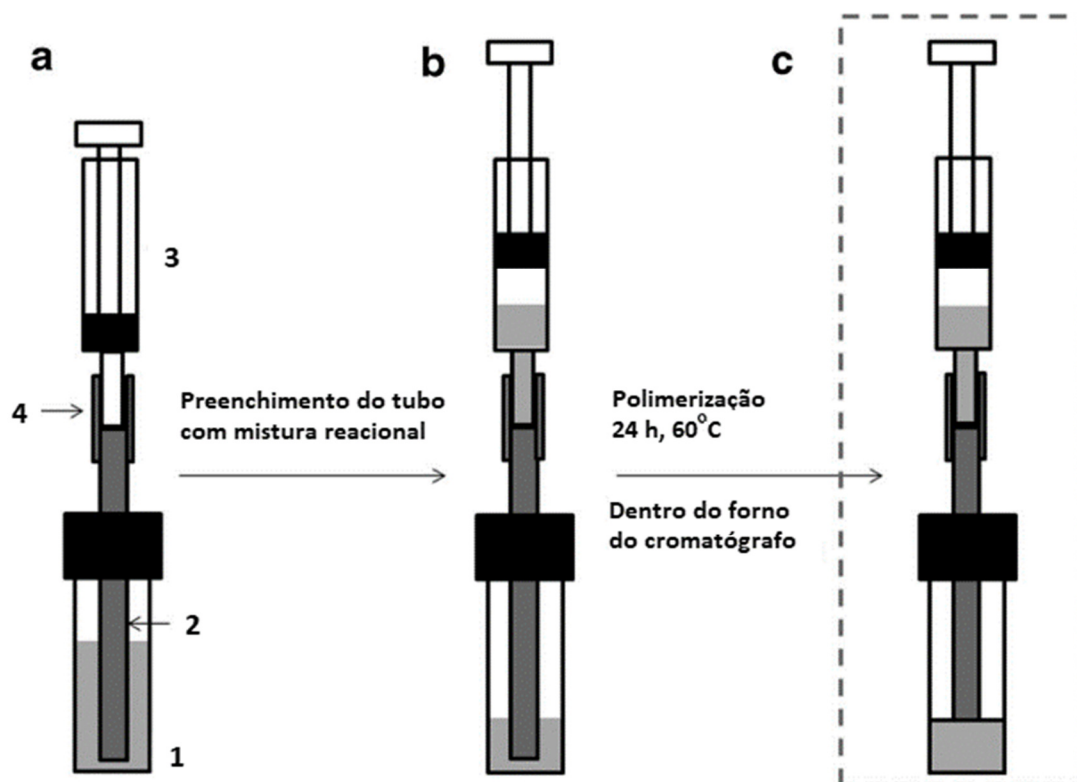


Figura 19: Abordagem para fazer a polimerização iniciada termicamente: a) Montagem do sistema contendo (1) vial, (2) coluna conectada à seringa (3) pelo tubo Pharmed® (4); b) Coluna preenchida pela aspiração da mistura reacional à seringa; c) transferência do sistema ao forno de um cromatógrafo a gás (adaptado da referência 76)

Depois disso a coluna foi lavada com acetonitrila por 1 hora na vazão de 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ para remover solventes porogênicos e monômeros não reagidos, usando uma bomba de HPLC. Finalmente a coluna foi lavada com água desionizada por mais 1 hora para remover o excesso de acetonitrila. A solução de funcionalização foi preparada com 5 g de ácido iminodiacético, 1 g de NaCl e 10,6 g de Na_2CO_3 dissolvido em 30 mL de água desionizada, com pH ajustado para 10,5 com NaOH. Então a mistura foi diluída em 50 mL de água desionizada. Usando uma bomba de infusão, 9,50 mL da solução de IDA foi bombeada a 6,6 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 24 horas pela coluna de poli (GMA-co-EDMA) imersa num

banho termostático na temperatura de 80°C [76]. Finalmente, a coluna foi lavada com água desionizada para remover o excesso de IDA.

2.3.3.3. Procedimento de extração em fase sólida assistida por análise por injeção sequencial (SIA-SPE) para detecção eletroquímica

O procedimento é baseado no arranjo experimental do sistema SIA-SPE apresentado na Figura 18. Enquanto o SIA faz o carregamento de amostra na coluna e lavagem da mesma, o potenciostato aplica o potencial de condicionamento de -0,2 V vs pseudo referência de Ag/AgCl. Primeiro, 1000 μL de T1 é aspirado à BS₁ (VS₁ na posição in). Simultaneamente, BS₂ aspira 300 μL de solução eluente (E). Quando BS₁ termina a aspiração, VR comuta à porta 5 e BS₁ (VS₁ na posição out) aspira 750 μL de amostra para a BC à 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. Depois disso, VR comuta à porta 2 e a amostra é injetada na coluna a 10 $\mu\text{L s}^{-1}$ pelas portas 6-1 da IV (posição mostrada na Figura 18). Essa etapa é repetida uma vez, totalizando 1500 μL de amostra carregados na coluna. Depois do fim do segundo ciclo de carregamento, a quantidade de T1 remanescente na BS₁ é enviada para a coluna monolítica (CM), assim removendo componentes da amostra não retidos, limpando a coluna de substâncias da matriz. Então o potenciostato aplica o potencial de deposição de -1,0 V (45 segundos) e a VI comuta para a posição de injeção, colocando BS₂ em linha com a CM pelas portas 3-4. A solução eluente é bombeada pelo sistema passando pela CM (10 $\mu\text{L s}^{-1}$) até a cela de fluxo eletroquímica (CFE), eluindo os analitos adsorvidos e carregando-os para serem depositados eletroquimicamente no eletrodo de trabalho. No fim dessa etapa, os metais depositados são reoxidados por uma corrente de 2 μA até que o potencial do eletrodo de trabalho mude de -1,0 para -0,2 V, momento em que são registrados os sinais cronopotenciométricos. Enquanto a reoxidação ocorre, BS₁ aspira sequencialmente 500

μL de T1 (VS_1 na posição in) e 500 μL de T2 (VS_1 na posição out) para a BC através porta 4 da VR ($100 \mu\text{L s}^{-1}$). Depois da reoxidação terminar, VI volta para a posição de carregamento, e BS_1 é esvaziada a $10 \mu\text{L s}^{-1}$ pela porta 2 da VR, enviando T2 para recondicionar a CM. Finalmente, as espécies oxidadas são lavadas da CFE. Isso é feito mantendo-se o potencial aplicado no eletrodo de trabalho à $-0,1 \text{ V}$ enquanto BS_2 injeta 300 μL de E, a $100 \mu\text{L s}^{-1}$, pelas portas 3-2 da VI (Figura 18).

2.3.4. Amostras

Amostras de água de torneira foram coletadas na Universidade de São Paulo, abastecida pela represa Guarapiranga, e na cidade de Guarulhos (São Paulo, Brasil), abastecida pelo sistema Cantareira. A amostra de água coletada no campus da USP foi analisada antes e depois de ser purificada por um sistema de filtração doméstico. Outra amostra foi coletada diretamente de uma represa localizada numa reserva florestal na cidade de Sumaré (São Paulo, Brasil). Essa amostra foi filtrada em um filtro de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro antes de ser analisada, enquanto as outras amostras foram analisadas diretamente.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Composição do monolito poli (GMA-co-EDMA)

Uma vantagem em utilizar colunas monolíticas poliméricas é a possibilidade de ajustar as propriedades morfológicas da coluna alterando-se a composição do monolito. Para ser usado em sistemas de análise por injeção sequencial, a estrutura porosa do monolito deve permitir o uso de vazões compatíveis com as pressões trabalháveis por bombas de seringa de vidro tipicamente usadas em buretas automáticas (50-80 psi, ou 3,44 – 5,51 bar), que são menores do que as pressões suportadas por bombas de sistemas cromatográficos. O monolito deve ter alta permeabilidade e alta capacidade de extração. Entretanto, essas duas características são conflitantes porque uma alta capacidade de extração implica em altas áreas superficiais, com pequenos microporos e mesoporos, enquanto para ter alta permeabilidade é necessário haver grandes poros de fluxo [77]. No presente estudo, a permeabilidade foi investigada variando a porcentagem de formador de ligação cruzada (EDMA), monômero funcional (GMA) e porcentagem e tipo dos solventes porogênicos na mistura reacional (Tabela 2). Na Tabela 2 a permeabilidade de cada coluna foi calculada de acordo com a Lei de Darcy:

$$K_0 = \frac{L\eta\mu_s}{\Delta p} \quad (2)$$

onde K_0 é a permeabilidade em m^2 , L é o comprimento da coluna em m, η é a viscosidade da fase móvel em cp ($1 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), μ_s é a velocidade linear do fluxo (m s^{-1}) e Δp é a pressão gerada, registrada pela bomba de um sistema de HPLC durante a lavagem do monolito com acetonitrila após o fim da etapa de polimerização, medida sob o fluxo de $500 \mu\text{L min}^{-1}$ de acetonitrila.

Tabela 2

Composição e permeabilidade dos monolitos testados

Monolito	Composição em % m/m								Permeabilidade (10^{-14} m ²)	Ref
	GMA	EDMA	CH	DOD	H ₂ O	TOL	PRO	BD		
1	22,5	7,5	28	-	-	42	-	-	-	80
2	18,75	6,25	6,8	68,2	-	-	-	-	5,78	79
3	18	12	23,3	46,7	-	-	-	-	21,0	81
4	12	8	26,7	53,3	-	-	-	-	-	81
5	30	10	-	-	5	-	35	20	43,3	78

CH = ciclo hexanol, DOD = dodecanol, TOL = tolueno, PRO = n-propanol, BD = 1,4 butanodiol

Os monolitos 1 e 4 se mostraram impermeáveis e tiveram o uso no SIA descartado. A permeabilidade do monolito 2 foi compatível com bombas de HPLC ($500 \mu\text{L min}^{-1}$), mas não com bombas de seringas de sistemas de SIA. O monolito 3 exibiu uma pressão que poderia ser trabalhável com uma vazão muito baixa, tornando o tempo de análise muito longo e em consequência reduzindo frequência de amostragem. Na tentativa de aumentar a permeabilidade do monolito 3, procurou-se aumentar o tamanho dos poros de fluxo aumentando-se a quantidade de solventes porogênicos na mistura reacional de 70% m/m para 80% m/m, mantendo a mesma razão de GMA para EDMA após a quantidade de monômeros ser diminuída de 30 para 20% (monolito 4). Entretanto, a grande proporção de solventes porogênicos na mistura produziu um monolito com baixa estabilidade mecânica, que colapsou sob o fluxo de acetonitríla, bloqueando os poros de fluxo e tornando o monolito 4 impermeável.

A distribuição do tamanho de poros é influenciada pela solubilidade do polímero nos solventes porogênicos. Se os solventes porogênicos são solventes ruins para o polímero, a separação de fase entre polímero formado e monômeros dissolvidos ocorre nos estágios iniciais da polimerização. O núcleo se torna um melhor solvente para os monômeros do que os solventes. Consequentemente, os monômeros dissolvem

preferencialmente nesses núcleos e não nos solventes. Conforme a polimerização e etapas de formação de ligação cruzada procedem nesses núcleos com alta concentração de monômeros, grandes aglomerados de glóbulos e poros de fluxo são formados, aumentando a permeabilidade [82]. A mistura porogênica usada para sintetizar o monolito 5 difere dos outros principalmente porque ela é constituída de um sistema ternário que contém água. Como água é um solvente muito ruim para o polímero e para os monômeros, a separação de fase ocorre precocemente, produzindo grandes poros de fluxo, o que explica a baixa pressão gerada pelo monolito 5 na etapa de lavagem (Tabela 2) [83]. Então, o monolito 5 foi o escolhido para o desenvolvimento do método.

2.4.2. Caracterização por Microscopia por varredura eletrônica (MEV)

Figuras 20.a e 20.b revelam que o monolito foi firmemente ancorado à superfície de sílica fundida, sem espaços entre o polímero e a parede do tubo. Os glóbulos de poli (GMA-co-EDMA) foram estimados entre 0,35 a 0,80 μm , com formato esférico regular, arranjado em clusters de estrutura cauliforme com tamanho entre 1 e 2 μm (Figura 20.d), e separados por grandes poros de fluxo com dimensões entre 2 e 5 μm (Figura 20.c), que foram responsáveis pela baixa resistência ao fluxo das colunas.

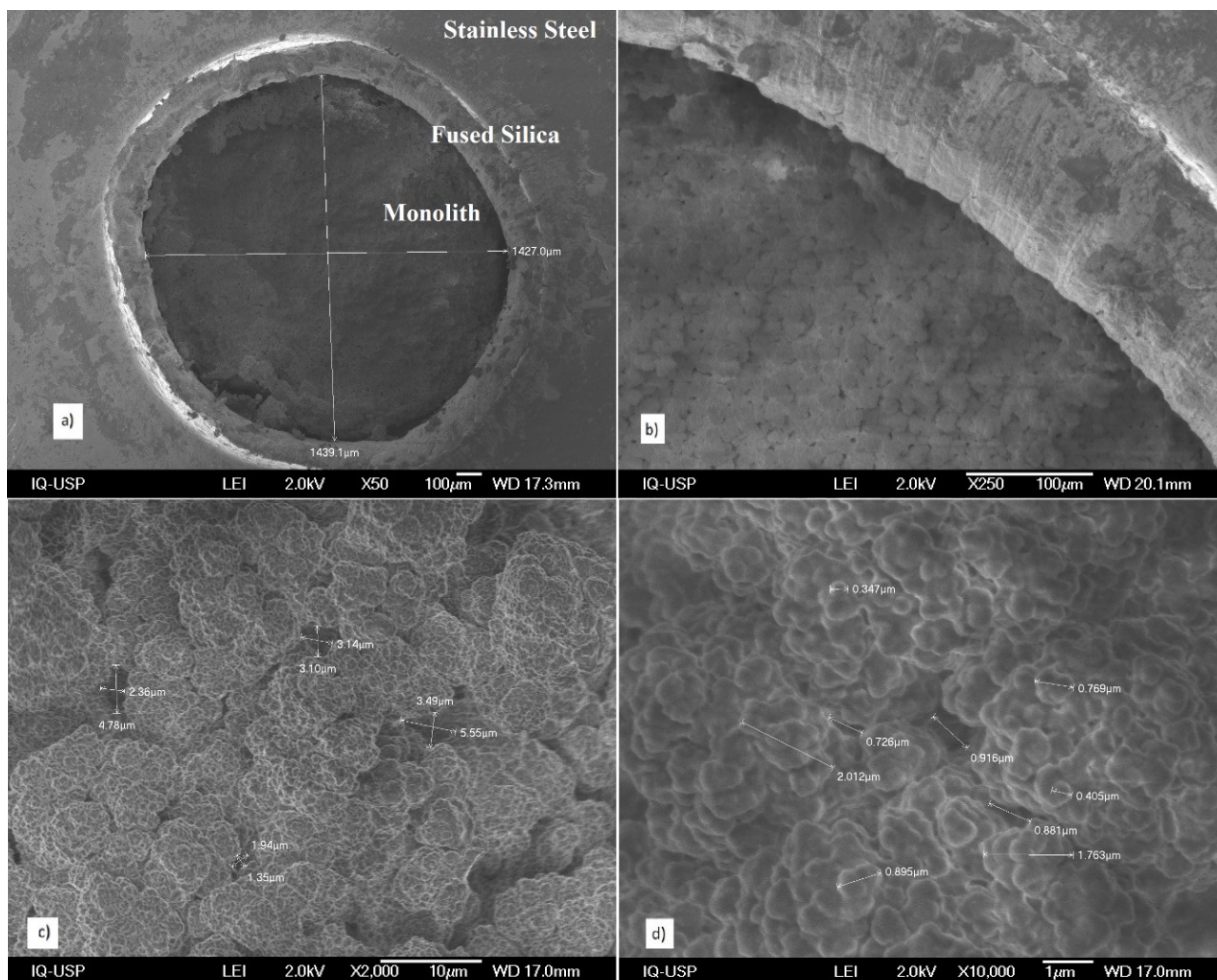


Figura 20. Imagens de MEV do monolito 5 de poli(GMA-co-EDMA). **(a)** Aumento de 50× da parte de cima da coluna; **(b)** Aumento de 250× da interface entre monolito e parede interna do tubo; **(c)** Aumento de 2000× do interior do poli(GMA-co-EDMA) com medidas dos tamanhos de alguns poros de fluxo; **(d)** Aumento de 10000× do interior do poli(GMA-co-EDMA) com medidas dos tamanhos de alguns glóbulos e clusters

2.4.3. Estudos de adsorção e eluição

2.4.3.1. Estudos iniciais

Ao incorporar o grupo IDA ao poli (GMA-co-EDMA) por reação de abertura de anel do grupo epóxi estamos criando um suporte de alta permeabilidade com grupos carregados negativamente expostos na superfície do polímero, contendo ainda átomos de oxigênio e nitrogênio com pares de elétrons livres para compartilharem com os íons metálicos e, portanto, com capacidade de formar quelatos com metais e, assim, extraí-los da amostra,

contrariamente ao monolito base, em que a superfície do polímero tem pouca afinidade pelos íons metálicos. Apesar de outras funcionalidades poderem ser testadas para modificar o monolito base, mantivemos o foco no IDA por ser o principal grupo quelante utilizado nas resinas mais difundidas comercialmente (Chelex-100, Muromac A1). Para observar esse efeito, nos primeiros estudos em relação à capacidade do monolito fazer a SPE foram comparadas as curvas de eluição do monolito base com o monolito após ser modificado com IDA. Os monolitos foram carregados até a saturação com solução de 10 mg L^{-1} de Cd^{2+} , lavados com água para retirar Cd^{2+} não retido e em seguida eluídos com $\text{HCl } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A corrente de redução de Cd^{2+} foi registrada na saída da coluna em função do tempo (amperometria a potencial constante de $-1,0\text{V}$ vs pseudo referência de Ag/AgCl). Os sinais obtidos na eluição do Cd^{2+} das colunas poli(GMA-co-EDMA) e poli(GMA-co-EDMA-IDA) mostraram que o íon metálico foi muito mais retido na coluna modificada com IDA (Figura 21) e que a intensidade do sinal produzido na eluição da coluna modificada poderia levar a um método de pré concentração de metais.

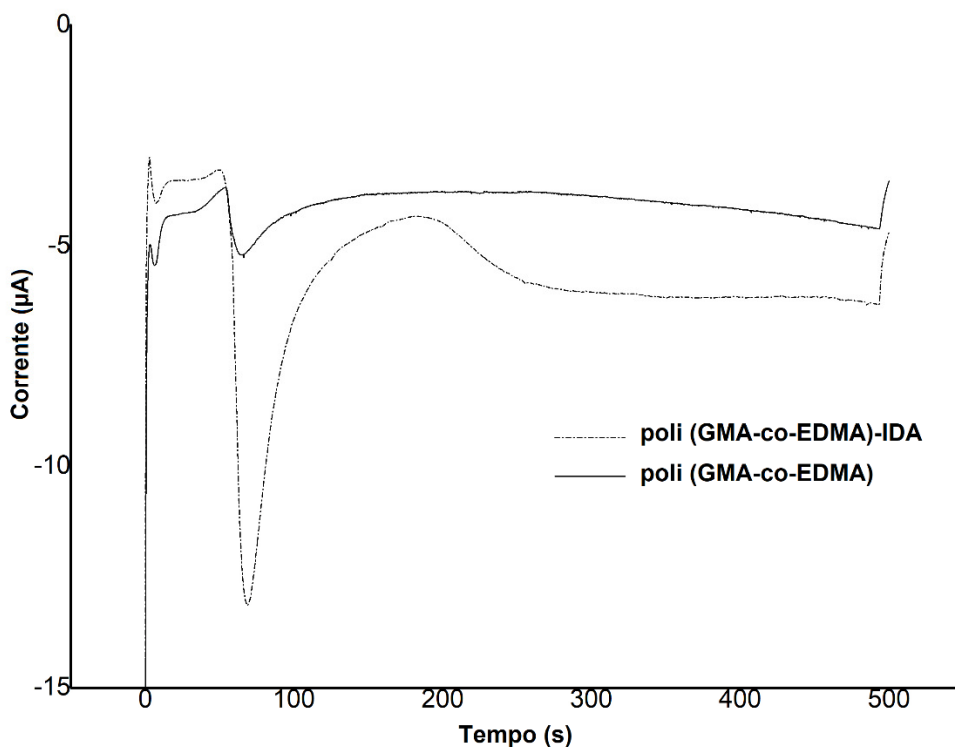


Figura 21: Amperogramas das curvas de eluição de colunas poli(GMA-co-EDMA) (sólido) e poli(GMA-co-EDMA)-IDA (pontilhado) previamente saturadas com Cd^{2+} . Solução eluente: HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; vazão: $10 \mu\text{L s}^{-1}$; potencial: $-1,0 \text{ V}$

Ainda usando a amperometria para monitorar a corrente devido à redução de Cd^{2+} na saída da coluna, foram comparadas curvas de calibração obtidas para as colunas modificada e não modificada, dessa vez com o auxílio do SIA de duas bombas para fazer ciclos de carregamento, lavagem, eluição e recondicionamento, além da válvula de injeção de 6 portas para comutar a coluna entre bomba de carregamento e bomba de eluição, num procedimento similar ao descrito no item 2.3.3.3. As curvas foram construídas no intervalo de $0,1$ a 20 mg L^{-1} de Cd^{2+} com volume de amostra de $500 \mu\text{L}$, sendo a eluição feita com $500 \mu\text{L}$ de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As curvas mostram que o sinal da coluna não modificada foi de mesma intensidade do branco, e por isso não estava retendo Cd^{2+} , enquanto a coluna modificada com IDA reteve o metal, e apresentou aumento linear do sinal com aumento da concentração, o que significa que nesse intervalo os sítios ativos não foram saturados e a eluição foi completa. Nas Figuras 22 e 23 estão apresentados os amperogramas e as curvas de calibração respectivamente.

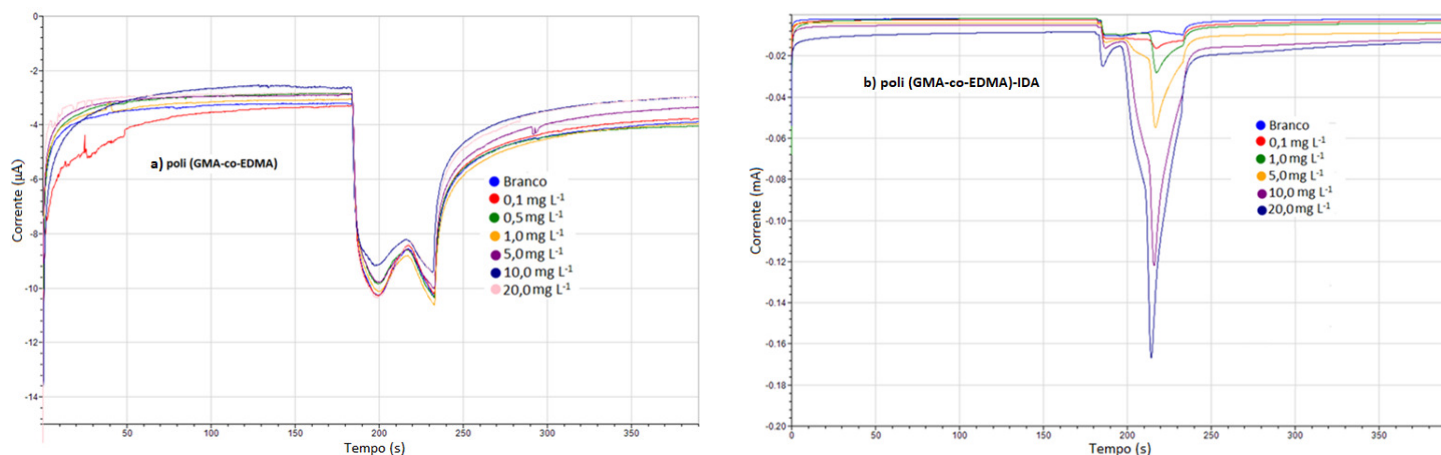


Figura 22: Amperogramas obtidos no sistema SIA-SPE com padrões de Cd^{2+} com a coluna não modificada (a) e modificada com IDA (b). volume de amostra = $500 \mu\text{L}$; Solução eluente: $\text{HCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; volume de eluente = $500 \mu\text{L}$; vazão = $10 \mu\text{L s}^{-1}$; potencial = $-1,0 \text{ V}$

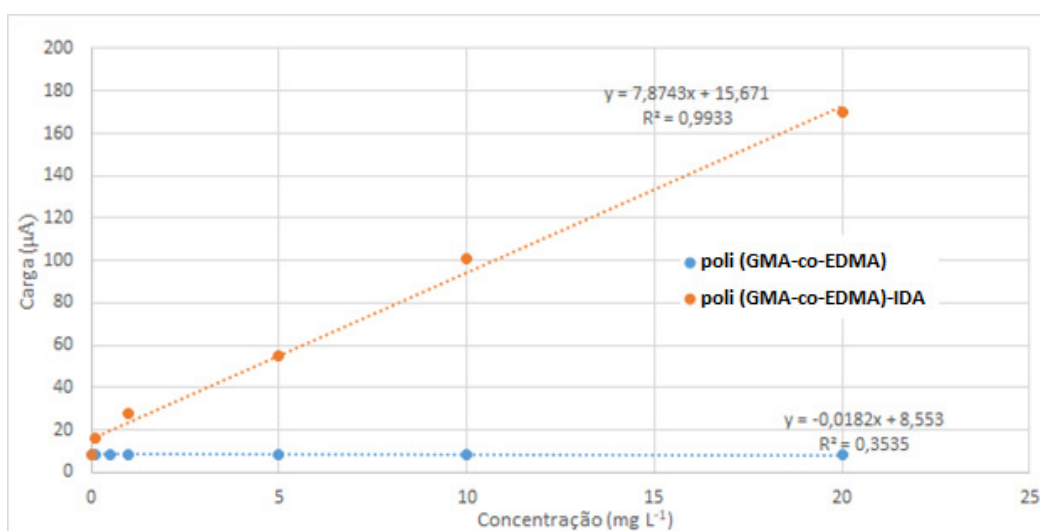


Figura 23: Variação do sinal com aumento da concentração de Cd^{2+} , construído com os amperogramas da Figura 22

2.4.3.2. Capacidade de adsorção

Após a coluna ser condicionada com tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl } 0,010 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=10$) e lavada com água para retirar o excesso de tampão, foi utilizada uma bomba infusora para enviar uma solução de $\text{Cu}^{2+} 20 \text{ mmol L}^{-1}$ pela coluna numa vazão de $150 \mu\text{L min}^{-1}$ para obter a curva de breakthrough. A curva foi obtida com monitoramento da

absorbância da solução de Cu^{2+} na saída da coluna com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 790 nm. Com essa curva é possível determinar a capacidade de adsorção através do volume de breakthrough, o volume a partir do qual é observado um aumento do sinal ao final da coluna, que só ocorre quando os sítios de adsorção estão saturados. O volume de breakthrough foi assumido como o volume em que a absorbância foi 1% do valor da absorbância atingida no estado estacionário (Figuras 24 a e c) [84]. A capacidade de adsorção (q_e) foi calculada por:

$$q_e = \frac{(t_{\text{B-IDA}} - t_0) \times Q \times c_{\text{Cu(II)}} \times 63,54}{L \times (1 \times 10^6)} \quad (2)$$

onde $t_{\text{B-IDA}}$ e t_0 são os tempos correspondendo ao volume de breakthrough e volume morto respectivamente, Q é a vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$), $C_{\text{Cu(II)}}$ é a concentração analítica de Cu^{2+} (mol L^{-1}), 63,54 é a massa atômica do cobre e L é o comprimento da coluna (m). A capacidade de complexação do monólito 5 (Tabela 2) de poli(GMA-co-EDMA) IDA foi de $4,4 \pm 0,3 \text{ mg Cu(II) m}^{-1}$, obtido como média de 3 replicatas, com desvio padrão relativo de 6,8 %. Assumindo que a conversão de monômeros/precursores em polímero foi de 100%, que o volume ocupado por monômero na coluna é igual à proporção na mistura reacional (40%) e que a densidade do polímero é 1 g cm^{-3} , a capacidade de adsorção da coluna foi $3,5 \text{ mg g}^{-1}$.

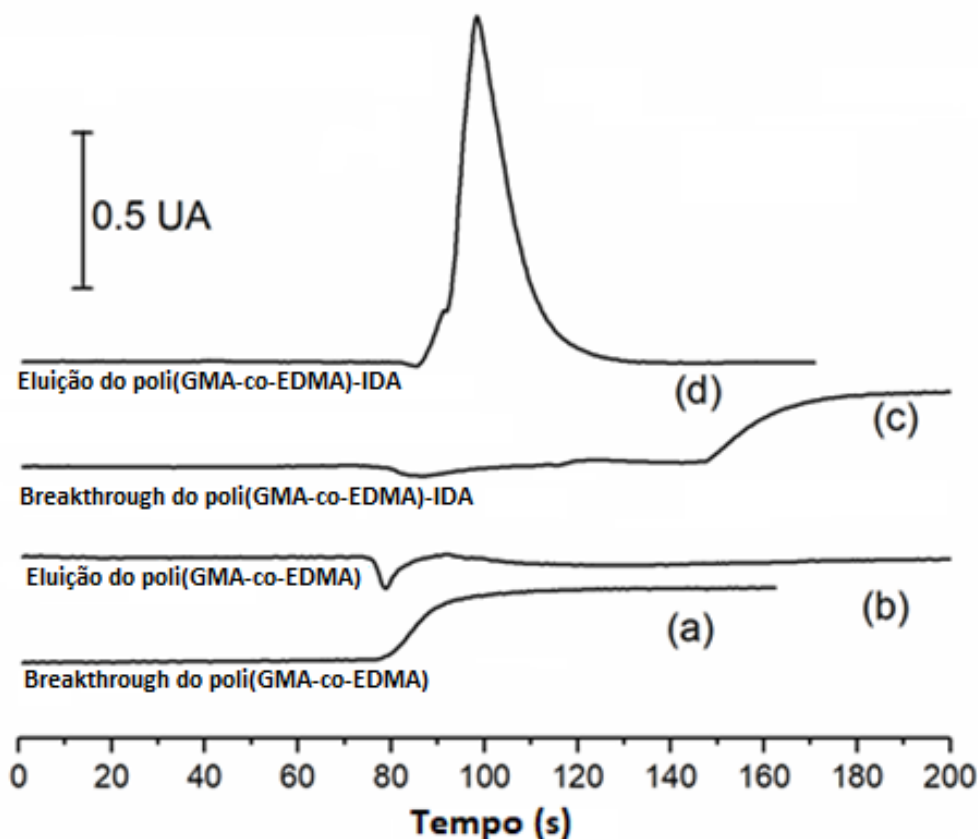


Figura 24: Breakthrough (a e c) e curvas de eluição (b e d) de colunas de poli(GMA-co-EDMA) (a e b) e poli(GMA-co-EDMA)-IDA (c e d). Curvas de breakthrough foram obtidas para uma solução aquosa de CuSO_4 20 mmol L^{-1} . Depois da saturação dos sítios de complexação as colunas foram lavadas com água desionizada e o Cu^{2+} retido foi eluído com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após a eluição, as colunas foram recondiçionadas com $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=10) e lavadas com água. Vazão = $2,5 \mu\text{L s}^{-1}$; Comprimento de onda monitorado = 790 nm .

A capacidade de extração é similar à de monolitos poli(GMA-co-EDMA)-IDA sintetizados em pequenos filtros de seringa ($5,0 \text{ mg g}^{-1}$) [80]. Quando comparada com outros trabalhos da literatura que utilizaram monolitos poli(GMA-co-EDMA) modificados com EDA (etileno diamina) sintetizados em colunas de $530 \mu\text{m}$ de diâmetro interno [85], a capacidade de adsorção obtida no presente estudo é significativamente maior ($3,5 \text{ mg g}^{-1}$ obtido $\times 0,78 \text{ mg g}^{-1}$ da literatura [85]). Entretanto, quando é feita a comparação com colunas de diâmetro semelhantes, à base de poli(GMA-co-EDMA)-EDA, sintetizadas em seringas de polipropileno para SPE off-

line [81], a capacidade de extração do nosso monolito modificado com IDA é notadamente menor ($3,5 \text{ mg g}^{-1}$ obtido $\times 70 \text{ mg g}^{-1}$ reportado na literatura) [81]. Para investigar a diferença na capacidade de adsorção preparamos o monolito poli(GMA-co-EDMA)-EDA seguindo o procedimento descrito por Wang et al [81]. Descobrimos que o motivo da baixa capacidade de adsorção é devido ao baixo grau de incorporação do IDA: a análise elementar para a coluna de IDA mostrou que a coluna teve incorporação de apenas $0,095 \pm 0,005 \text{ m/m } \%$ de Nitrogênio, enquanto a mesma análise para a coluna modificada com EDA mostrou a incorporação de $5,72 \%$ m/m de Nitrogênio. A curva de breakthrough obtida para a coluna de poli(GMA-co-EDMA)-EDA (Figura 25) resultou numa capacidade de adsorção de 41 mg g^{-1} . Da Figura 25 pode se observar o volume de breakthrough de poli(GMA-co-EDMA)-EDA na região de 1000 segundos, enquanto da Figura 24 c o volume de breakthrough da coluna poli(GMA-co-EDMA)-IDA nas mesmas condições experimentais ocorre em torno de 150 segundos. Apesar da alta capacidade de adsorção da coluna modificada com EDA nós desenvolvemos o método com IDA por ele ser um dos agentes quelantes mais presentes em suportes sólidos para SPE de uma grande variedade metais e metalóides [80]. Além disso, o uso de monolitos modificados com IDA ou EDA acoplados em sistemas SIA para SPE on-line ainda não foi citado na literatura. O formato de monolito agrega a vantagem da rigidez do polímero, em comparação com métodos que utilizaram IDA como agente quelante imobilizado em outros tipos de fase estacionária, como partículas de polímeros. Os polímeros particulados modificados com IDA, ao serem acoplados no SIA tinham que ser preenchidos na coluna enquanto encolhidos porque apresentavam um inchamento muito pronunciado, e essa variação no volume das partículas durante a análise, que pode ocorrer se a amostra for muito ácida ou básica por exemplo, é um problema na robustez da análise, e é pouco pronunciado no caso dos monolitos [88, 89].

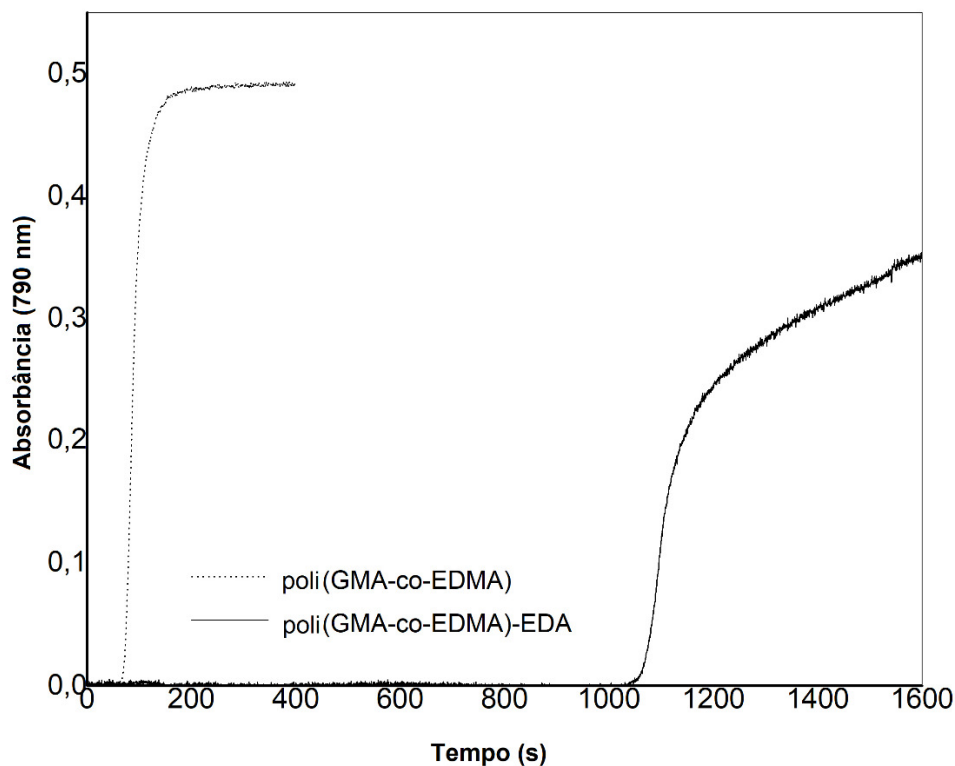


Figura 25: Curvas de Breakthrough de colunas de poli(GMA-co-EDMA) e poli(GMA-co-EDMA)-EDA. As curvas foram obtidas com uma solução aquosa de CuSO_4 $0,020 \text{ mol L}^{-1}$. Vazão = $2,5 \mu\text{L s}^{-1}$. Comprimento de onda monitorado = 790 nm .

Após saturação com solução Cu^{2+} , o excesso de metal foi retirado da coluna com água desionizada, seguido da eluição com HNO_3 (Figura 24 b e d). A retenção e eluição de Cu^{2+} do poli(GMA-co-EDMA)-IDA pode ser claramente observada em comparação com a coluna não modificada. Acidificação da coluna não modificada poli(GMA-co-EDMA) não mostra o pico transiente correspondendo à eluição do Cu^{2+} , confirmando que o Cu^{2+} não estava retido. Para a poli(GMA-co-EDMA)-IDA, um grande pico de absorbância transiente é observado com a acidificação (Figura 24 d), indicando que o Cu^{2+} foi retido na solução neutra, e liberado após eluição com HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. A diferença de absorbância entre o pico de eluição e o estado estacionário atingido após o breakthrough da coluna poli(GMA-co-EDMA)-IDA, mostra que a concentração máxima do analito no eluato é muito maior do que na amostra original, e indica que a extração pode levar a um método mais sensível do que sem a pré-concentração em

coluna, o que pode ser de grande importância, principalmente em métodos espectrofotométricos que necessitam de formas de pré-concentração para aumentar a sensibilidade, como aumento da caminho óptico.

2.4.4. Desenvolvimento de método

Para desenvolver o método de detecção eletroquímica on-line com extração em fase sólida assistida por SIA, primeiramente foi investigada a influência do volume de amostra e também da composição e volume da solução eluente sobre o sinal analítico de uma solução de Cd^{2+} $100 \mu\text{g L}^{-1}$. O efeito da vazão não pôde ser avaliado pela limitação de pressão do sistema SIA, e foi fixada a um valor de $10 \mu\text{L s}^{-1}$.

2.4.4.1. Volume de amostra

O volume de amostra determina diretamente a quantidade de metal retida na coluna e depositada em seguida no eletrodo de trabalho. Em sistemas de fluxo também determina o tempo de análise, pois quanto maior o volume mais demorado se torna a passagem da amostra pela coluna e sobre o eletrodo. Grandes quantidades de amostra aumentaram o sinal analítico, como é observado na Figura 26 (reforça-se que o sinal obtido na cronopotenciometria é a área dos picos do gráfico $dt/dE \times E$, que resulta em unidades de carga – Coulombs). O volume de amostra de $2000 \mu\text{L}$ produziu um “ombro” em potenciais mais negativos, sugerindo a saturação do filme fino de mercúrio. Então, o volume de amostra de $1500 \mu\text{L}$ foi o escolhido para o método porque a frequência de amostragem foi razoável, de 6,8 injeções por hora, e a quantidade de metal depositada não saturou o eletrodo de trabalho durante a etapa de deposição. Com $1500 \mu\text{L}$ houve um ganho considerável de sinal em relação a volumes menores e o tempo de análise não ficou tão longo a ponto de inviabilizar a análise.

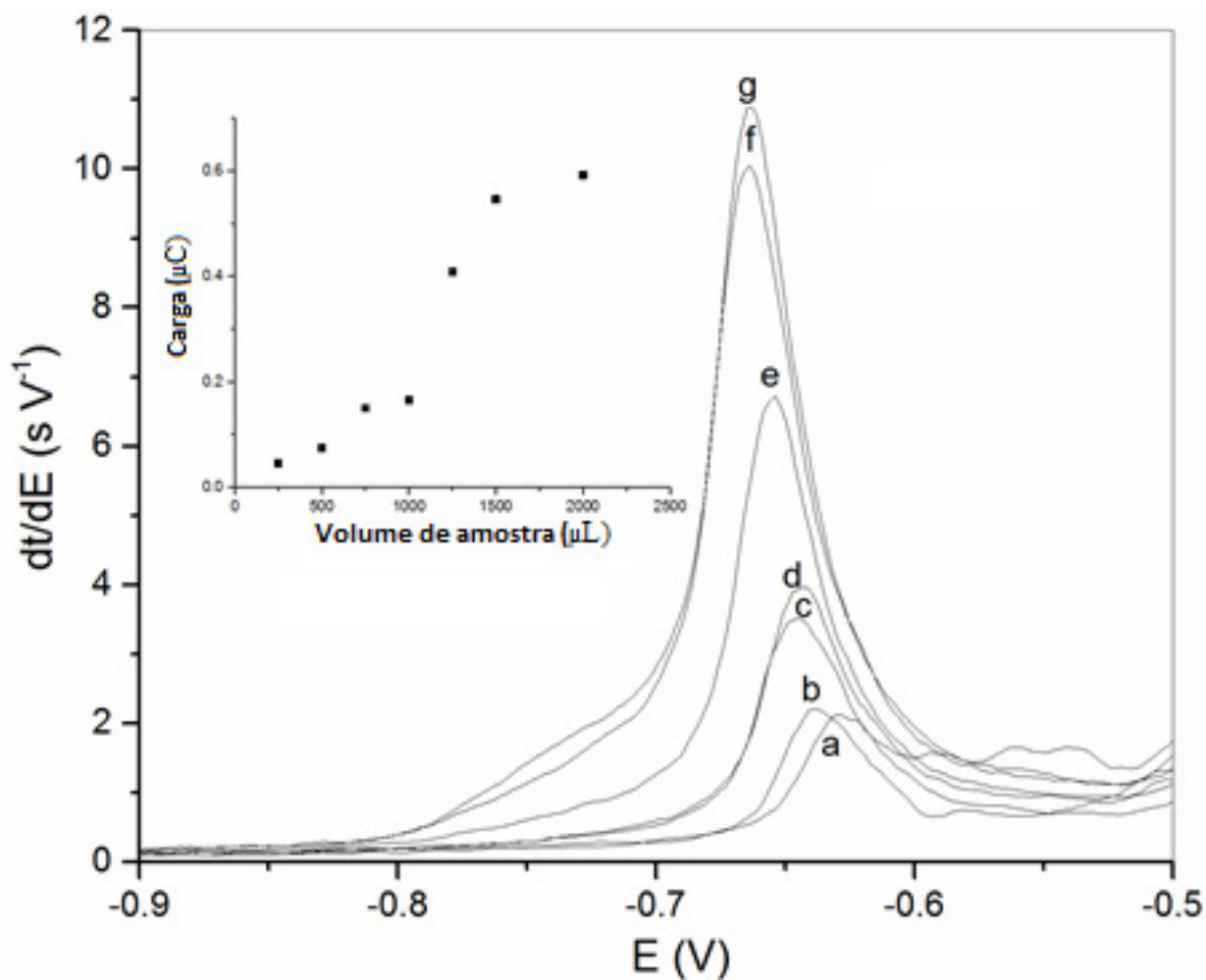


Figura 26: Influência do volume de amostra sobre a carga obtida para uma solução de Cd^{2+} $100 \mu\text{g L}^{-1}$: (a) 250, (b) 500, (c) 750, (d) 1000, (e) 1250, (f) 1500 e (g) 2000 μL . Condições experimentais: solução eluente = 500 μL de HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl ; vazão = $10 \mu\text{L s}^{-1}$; potencial de deposição = $-1,0 \text{ V}$; potencial final = $-0,45 \text{ V}$; corrente de oxidação = $2 \mu\text{A}$

2.4.4.2. Volume, concentração e composição de eluente

Os primeiros testes de eluição, feitos com 500 μL de HCl $0,50$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 27) eluindo os íons Cd^{2+} contidos em 1500 μL de solução mostraram pouca diferença na carga relacionada à redissolução, indicando que HCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ continha concentração de íons H^+ suficiente para protonar os sítios de IDA, revertendo a afinidade com os metais e liberando os mesmos em solução. O aumento da concentração de HCl de $0,50$ para $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ moveu os picos de oxidação para potenciais menos negativos. Para minimizar a influência dos cloro-complexos no

potencial de reoxidação a composição da solução eluente foi alterada para HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de H^+ alta e Cl^- baixa. Além disso, a concentração de Cl^- deve ser mantida constante porque ao se trabalhar com sensores impressos que utilizam eletrodo de Ag para servir como pseudo-referência Ag/AgCl , é necessário que a Ag esteja em contato com uma concentração constante de Cl^- para que o potencial de referência seja constante [73], por isso a solução eluente, a única que tem contato direto com o eletrodo, foi preparada na presença de NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

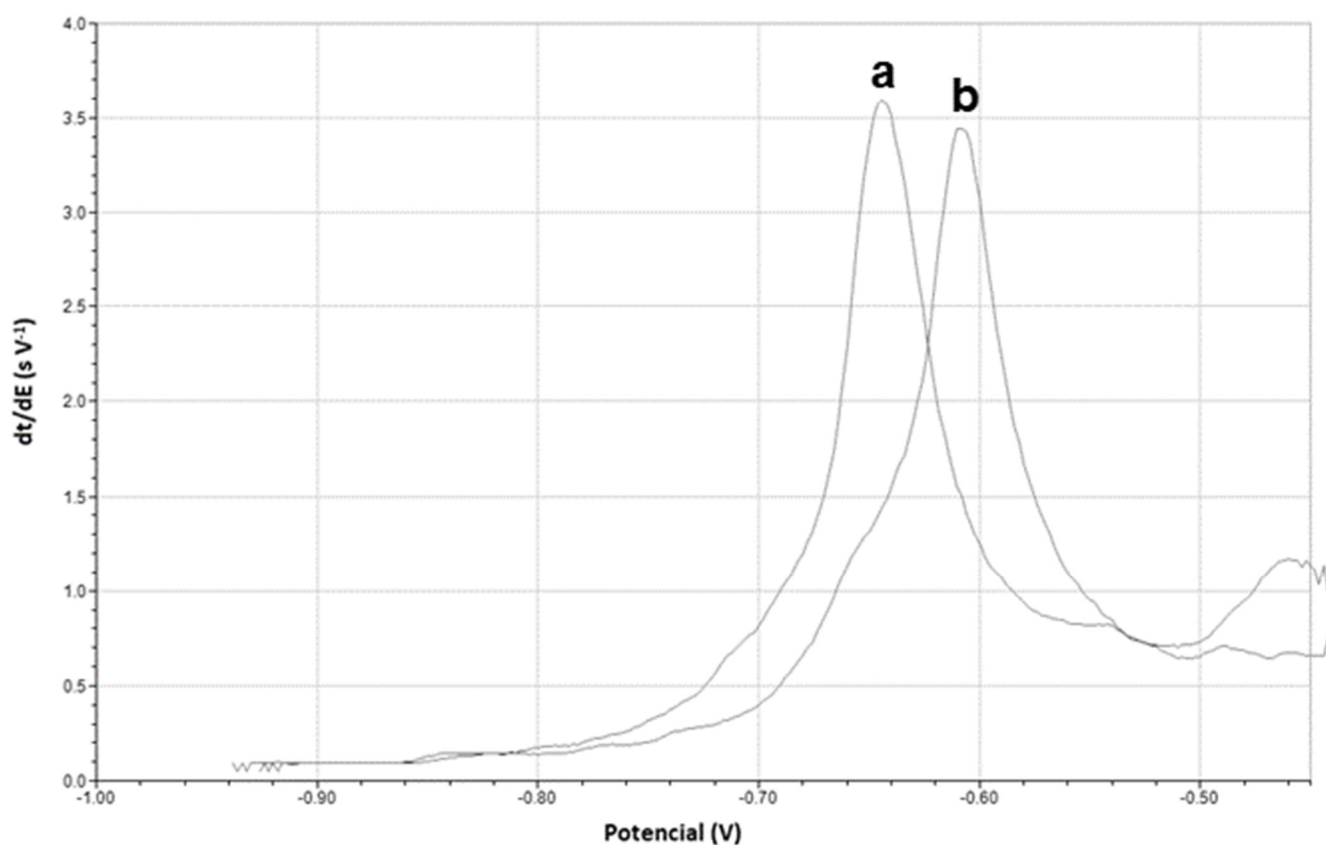


Figura 27: Influência da concentração de HCl sobre o sinal analítico. Solução eluente de HCl (a) $0,5$ e (b) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Condições experimentais: Concentração do padrão de $\text{Cd}^{2+} = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$; volume de amostra = $1500 \mu\text{L}$; volume de eluente = $500 \mu\text{L}$; vazão = $10 \mu\text{L s}^{-1}$; potencial de deposição = $-1,0 \text{ V}$; potencial final = $0,45 \text{ V}$; corrente de oxidação = $2 \mu\text{A}$

O volume da solução de HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi variado de 200 a $400 \mu\text{L}$, e adotando o volume de $300 \mu\text{L}$, o sinal se aproximou de um estado

estacionário para ambas as concentrações de 5 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões de Cd^{2+} (Figura 28). Na eluição com volumes maiores que 400 μL houve um decréscimo no sinal para ambas as soluções 5 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, portanto o volume de 300 μL foi adotado, definindo o procedimento de extração em fase sólida assistida por análise por injeção sequencial (SIA-SPE) para detecção eletroquímica.

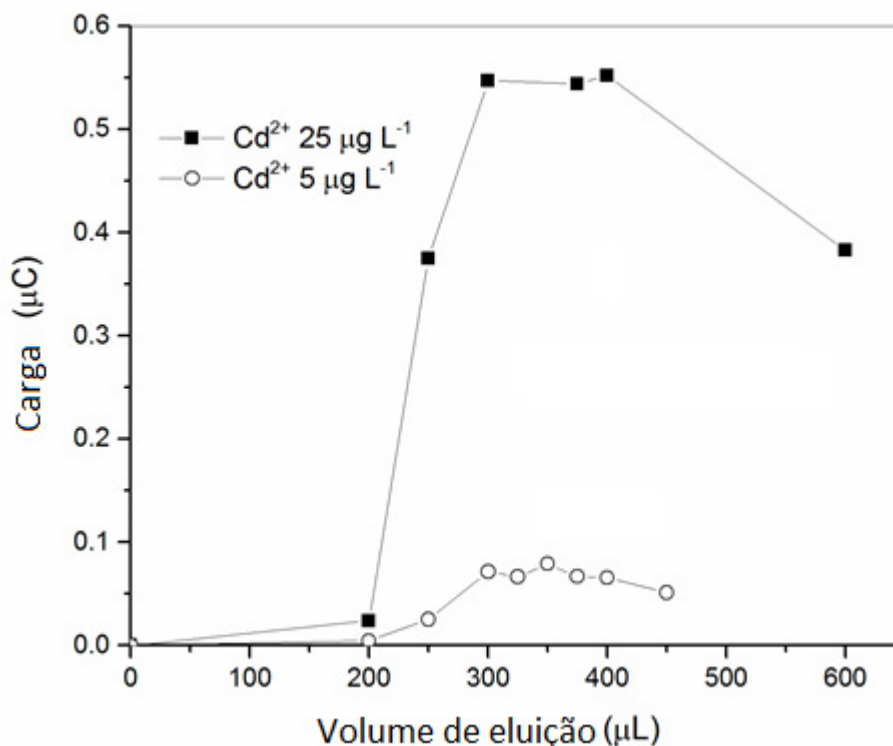


Figura 28: Carga em função do volume de eluente para soluções de Cd^{2+} de diferentes concentrações. Volume de amostra: 1500 μL ; Solução eluente: 0,50 mol L^{-1} HNO_3 em 0,10 mol L^{-1} NaCl ; vazão: 10 $\mu\text{L s}^{-1}$; potencial de deposição: $-1,0$ V; potencial final: $-0,45$ V; corrente de oxidação: 2 μA

2.4.5. Figuras de mérito

Com os parâmetros definidos no desenvolvimento do método, curvas de calibração foram construídas para Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , separados em soluções individuais (Figura 29). As curvas de calibração exibiram alta linearidade ($r^2 > 98$) entre 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram calculados com $\text{LD} = 3 S_d/m$ e $\text{LQ} = 10 S_d/m$ (Tabela 3), onde m é a inclinação da curva de calibração e S_d é o desvio padrão de nove réplicas da solução 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 29).

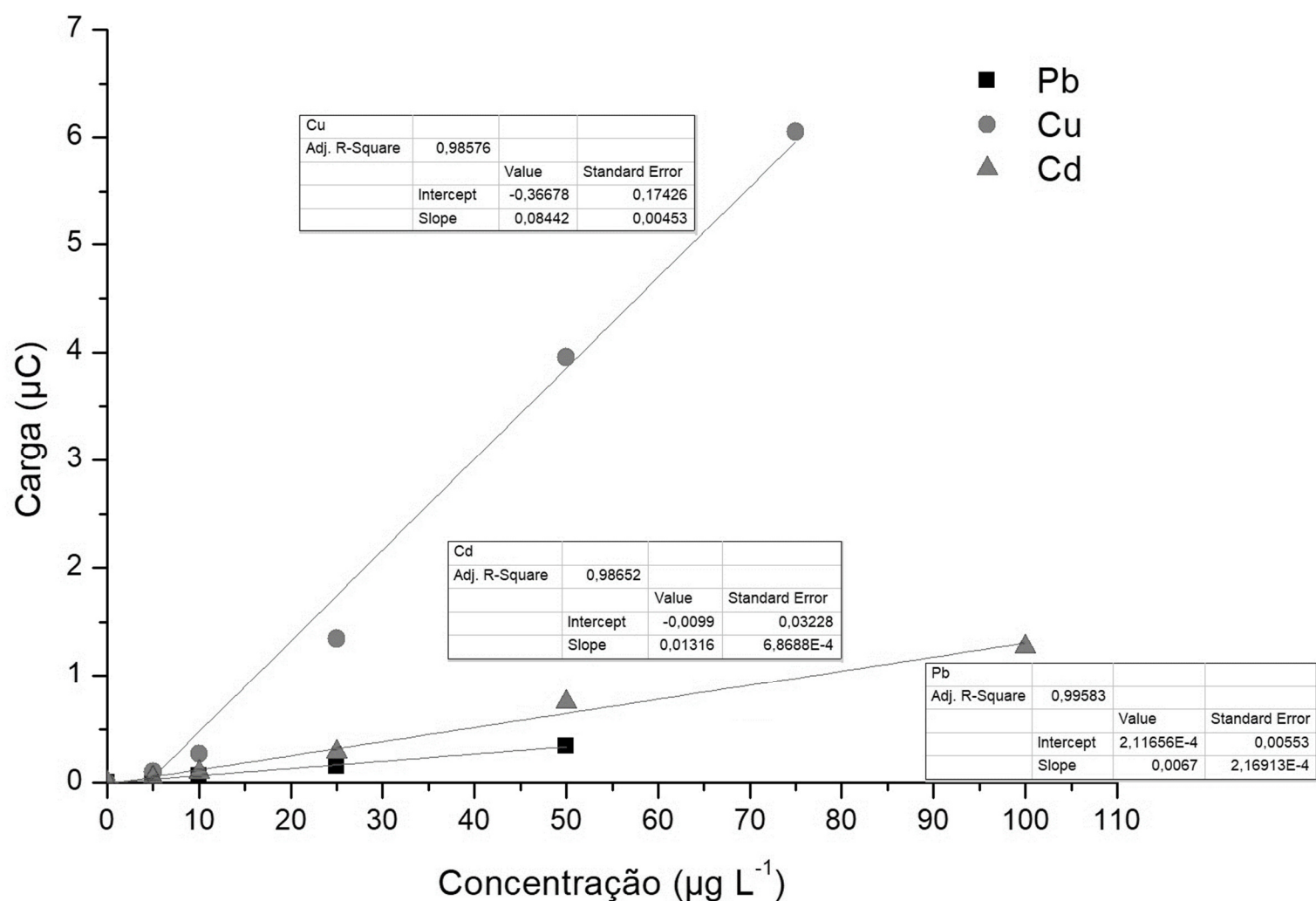
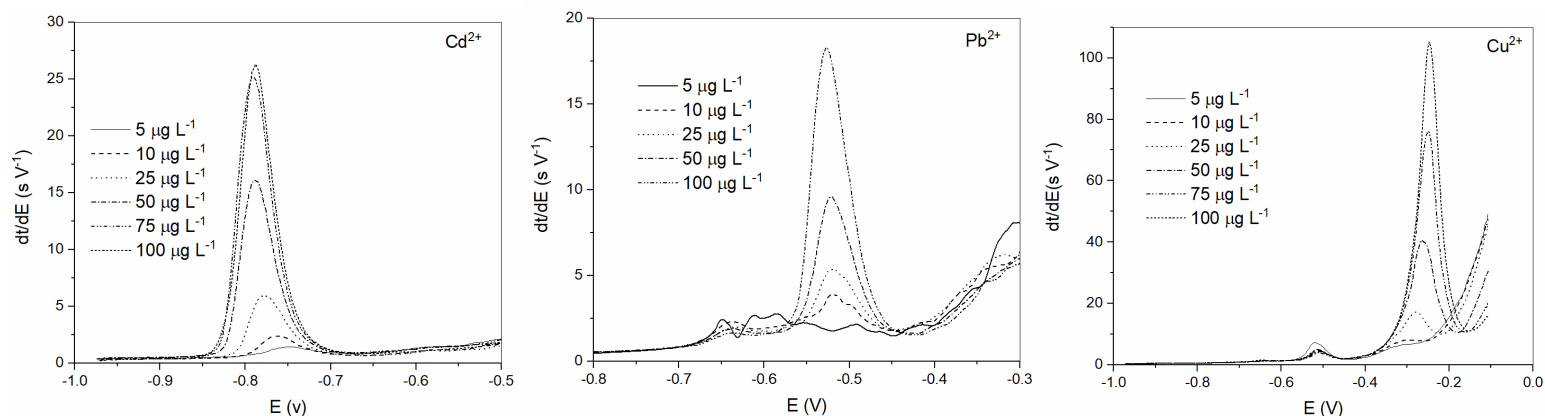


Figura 29: Cronopotenciogramas (acima) e curvas de calibração construídas a partir de soluções individuais de Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ preparados em tampão MES 0,010 mol L⁻¹ (pH 6,0) em 0,10 mol L⁻¹ NaCl, obtido após carregamento de 1500 µL das soluções na coluna de poli(GMA-co-EDMA)-IDA, e eluição com 300 µL de HNO₃ 0,50 mol L⁻¹ em 0,10 mol L⁻¹ NaCl sob vazão de 10 µL s⁻¹. Potencial de deposição: -1,0 V, potencial final: -0,1 V, Corrente de oxidação: 2 µA

Tabela 3

Coeficiente linear, Coeficiente angular, correlação linear, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para Cd²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ em soluções individuais

Íon metálico	Coeficiente linear (μC)	Coeficiente angular/ 10^3 ($\mu\text{C L } \mu\text{g}^{-1}$)	R ²	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cd ²⁺	-0,01 \pm 0,03	13,2 \pm 0,7	0,99	1,0	3,3
Pb ²⁺	0,006 \pm 0,03	6,7 \pm 0,2	0,99	0,7	2,2
Cu ²⁺	-0,4 \pm 0,2	84 \pm 4	0,99	0,5	1,8

Os limites de detecção para os três metais ficaram abaixo das concentrações máximas permitidas (CMP) para águas de torneira e potáveis estabelecidas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Cd, 1300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Cu e, para o Pb, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ é o nível de ação [86]), mostrando que o método tem sensibilidade adequada para quantificar os níveis desses poluentes metálicos em águas potáveis.

A repetibilidade das medidas foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos valores de carga de nove medidas obtidas para a solução de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ contendo a mistura dos três metais. Os valores foram de 7,4 %, 5,7 % e 4,7 % para o Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺, respectivamente. Essa sequência de medidas (Figura 30) demonstrou ausência de efeitos de memória, e que o procedimento foi adequado para ser usado na eluição e recondição da coluna.

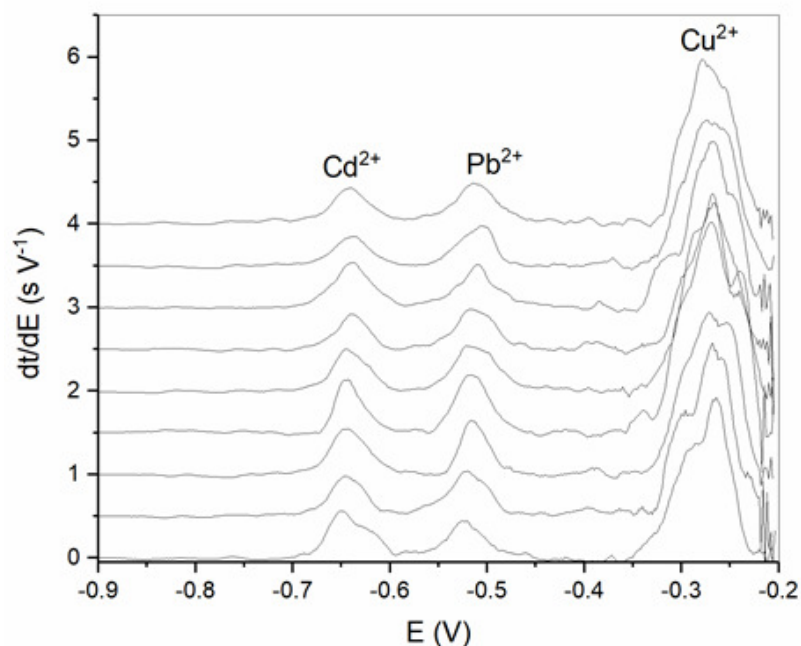


Figura 30: Cronopotenciogramas subtraídos do branco obtidos em sequência para uma solução de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} na concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ mostrando que a contaminação entre medidas (efeito de memória) foi desprezível sob as condições de eluição e recondicionamento usadas. As Condições experimentais são as mesmas da legenda da Figura 29

2.4.6. Interferentes

Para avaliar a potencial interferência de íons comumente encontrados na água, uma solução de Cd^{2+} de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada na presença desses íons e o sinal de carga foi comparado com o da solução contendo somente Cd^{2+} . A concentração de alguns íons foi escolhida com base nas CMP para águas “Classe 3”, definidas pela resolução CONAMA 357 como a classe de águas que pode ser destinada ao consumo humano após tratamento avançado ou convencional, ou seja, uma água possivelmente poluída e que contém potenciais interferentes [87]. A Tabela 4 mostra que de maneira geral a interferência dos cátions foi baixa (<10 %). Foi observada uma interferência positiva para o Cl^- ao mudar sua concentração de 12,5 para 250mg L^{-1} , sugerindo que a quantidade de metal complexada depende da concentração de Cl^- no meio. Então, foi importante manter a concentração de Cl^- constante durante as análises com o

condicionamento das amostras e padrões com tampão MES 0,010 mol L⁻¹ (pH = 6) e NaCl 0,010 mol L⁻¹ para evitar que alteração na concentração de Cl⁻ influenciasse no sinal obtido. Outra influência positiva no sinal foi a do ácido fúlvico, que forma complexos fracos com Cd²⁺. Pode-se especular que esses complexos acessam mais facilmente os sítios de IDA na estrutura porosa da coluna do que Cd²⁺ hidratado ou que os hidroxocomplexos de Cd²⁺, resultando em maior retenção e, conseqüentemente, resultando num maior sinal analítico. Por outro lado, a presença de ácido húmico com Cd²⁺ leva à formação de complexos com coeficientes de difusão menores do que os dos íons livres, e o desvio de sinal na sua presença como interferente foi menor do que o DPR das medidas nesse nível de concentração (Figura 30), indicando que a extração e troca de matriz promovida pela coluna de poli(GMA-co-EDMA)-IDA contorna a possível interferência causada pela formação lábeis, mas com baixa difusibilidade.

Tabela 4

Efeito de espécies potencialmente interferentes na área de pico de uma solução de Cd²⁺ 5 µg L⁻¹

Espécie Interferente	Concentração (mg L ⁻¹)	Desvio na área do pico do Cd(II) (%)
Al ³⁺	0,2	+ 8,5
Fe ³⁺	5	+ 8,1
Mg ²⁺	120	- 0,3
Cu ²⁺	0,013	+ 2,3
Pb ²⁺	0,033	+ 3,2
Ca ²⁺	0,2	+ 18
Cl ⁻	250	+ 172
Cl ⁻	12,5	- 0,35
Ácido Fúlvico	5	+ 17
Ácido Húmico	5	+ 3,7

2.4.7. Determinação simultânea de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+}

O baixo nível de interferência de Cu^{2+} (+2,3 %) e Pb^{2+} (+3,2 %) no sinal de Cd^{2+} sugeriu que o método poderia ser empregado para fazer a determinação simultânea desses metais. As interferências em realizar isso seriam causadas pela complexação preferencial de algum metal na coluna, ou por eluição incompleta [90]. Para investigar a determinação simultânea, foram construídas curvas de calibração na faixa de 5 – 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os três metais misturados na mesma solução (Figura 31). Os coeficientes angulares e lineares não diferem significativamente dos obtidos com as curvas dos metais em soluções individuais (Tabela 5, Figura 32), indicando que em concentrações baixas as curvas de calibração para cada metal são independentes dos outros dois. Para essa comparação as curvas dos metais separados e misturados foram feitas com o mesmo sensor impresso.

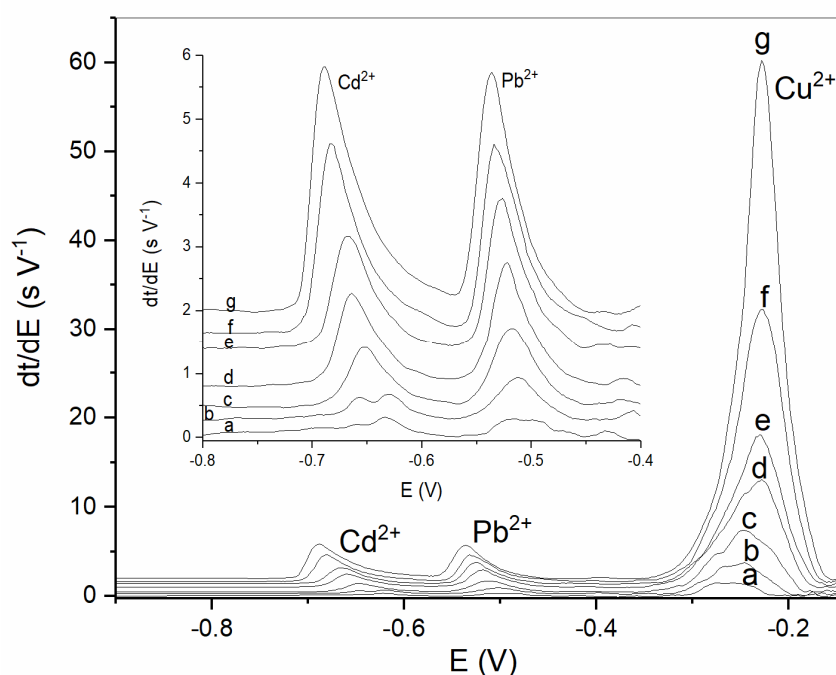


Figura 31: Cronopotenciogramas subtraídos do branco para a construção de curvas de calibração da mistura de Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} nas concentrações de (a) 5, (b) 10, (c) 20, (d) 40, (e) 60, (f) 80 and (g) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparados em tampão MES 0,010 mol L^{-1} (pH 6.0) em NaCl 0,010 mol L^{-1} . Cronopotenciogramas foram obtidos após carregamento de 1500 μL das soluções na coluna de poli(GMA-co-EDMA)-IDA, e eluição com 300 μL de HNO_3 0,50 mol L^{-1} em 0,10 mol L^{-1} NaCl sob vazão de 10 $\mu\text{L s}^{-1}$. Potencial de deposição: -1,0 V, potencial final: - 0,1 V, Corrente de oxidação: 2 μA

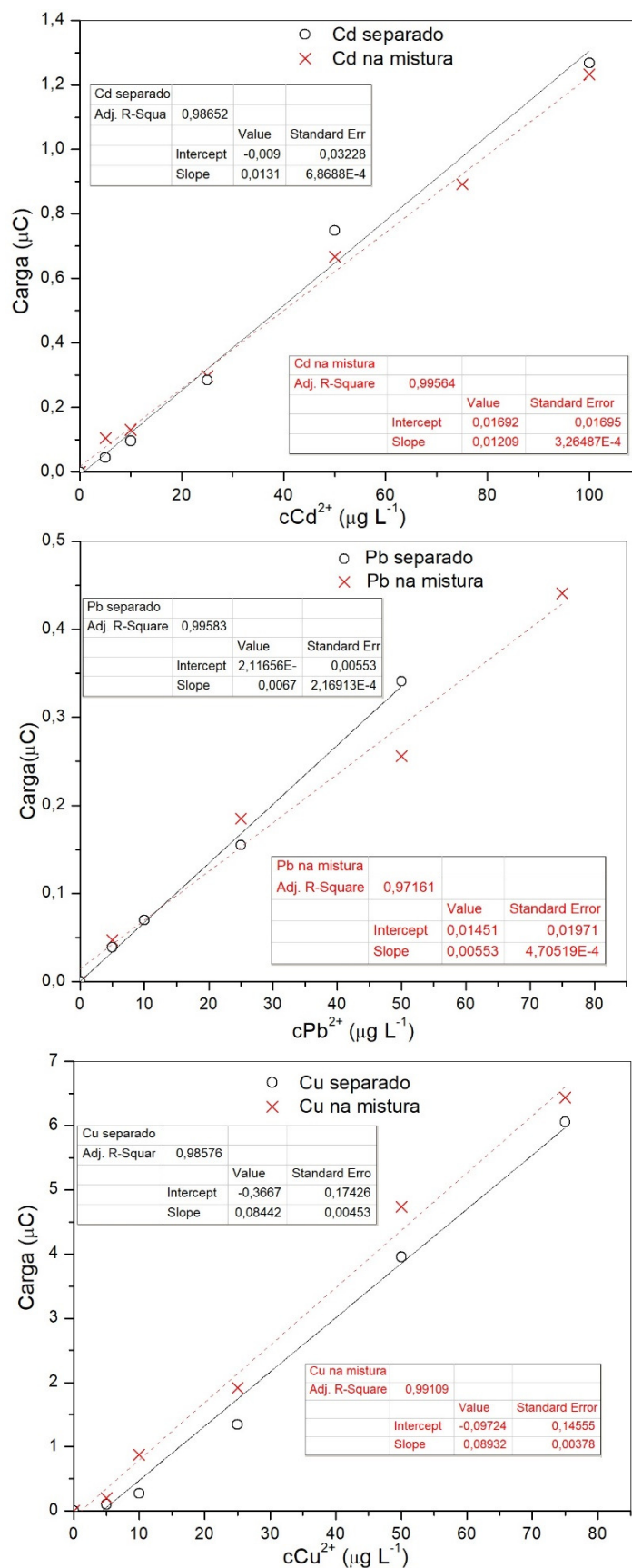


Figura 32: Curvas de calibração construídas a partir dos cronopotenciogramas da Figura 31 para o Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} misturados na mesma solução, e sua comparação com as curvas de calibração para os mesmos metais em soluções individuais. Condições experimentais são as mesmas da legenda da Figura 31

Os limites de detecção e quantificação não diferiram significativamente daqueles obtidos a partir de soluções individuais (Tabela 3). Para investigar a resposta do método em concentrações próximas às daquelas do LD e LQ, foram obtidos cronopotenciogramas de soluções contendo misturas dos três metais com concentrações 0,50, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, confirmando que esses valores são realísticos, visto que mesmo para 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ o cronopotenciograma apresenta sinal razoavelmente distinguível do branco (Figura 33), principalmente para o Cu^{2+} , embora as medidas quantitativas sejam pouco confiáveis, já que as concentrações são abaixo ou próximas do LQ. Esses cronopotenciogramas confirmaram que o cálculo estatístico para encontrar LD e LQ, baseado no desvio padrão relativo das áreas dos picos de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e inclinação da curva de calibração tem correlação com a real detectabilidade do método proposto.

Tabela 5

Coeficiente linear, Coeficiente angular, correlação linear, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} misturados na mesma solução

Íon metálico	Coeficiente linear (μC)	Coeficiente angular/ 10^3 ($\mu\text{C L } \mu\text{g}^{-1}$)	R^2	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cd^{2+}	$0,02 \pm 0,02$	$12,1 \pm 0,3$	0,99	1,2	3,8
Pb^{2+}	$0,01 \pm 0,02$	$5,5 \pm 0,5$	0,98	1,4	4,7
Cu^{2+}	$-0,1 \pm 0,2$	89 ± 4	0,99	0,51	1,7

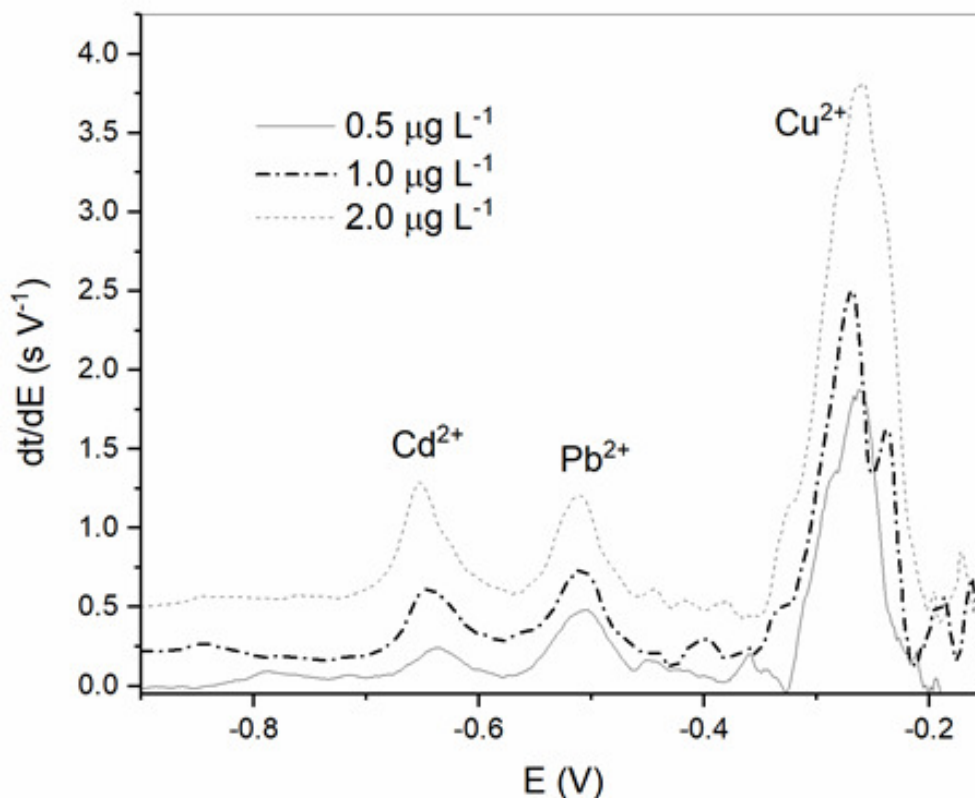


Figura 33: Cronopotenciogramas subtraídos do branco para a mistura dos três metais para investigação experimental dos limites de detecção e quantificação. Condições experimentais iguais à da Figura 31

2.4.8 Aplicações

O método foi aplicado a algumas amostras de água e as concentrações dos analitos foram encontradas por curvas de calibração externas ($n=3$). Foram analisadas amostras de água coletadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, uma amostra diretamente da torneira e uma amostra após passar por filtragem em filtro convencional. Também foi analisada uma amostra de água de torneira residencial do município de Guarulhos/SP e uma amostra de água de uma represa localizada no município de Sumaré/SP (Figuras 34 - 37). Para cada amostra uma curva de calibração foi construída, visto que as análises foram feitas com eletrodos diferentes (em cada dia de trabalho um eletrodo novo com filme de mercúrio intacto é usado, o que requer a construção de uma nova curva de calibração), exceto para a água de Guarulhos e água

de filtro da USP, que foram analisadas no mesmo dia com o mesmo eletrodo. A exatidão das medidas foi avaliada por testes de adição e recuperação da CMP da resolução CONAMA 357 para águas “classe 3” ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $33 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+}) [87]). A seguir são apresentados os cronopotenciogramas subtraídos do branco das amostras e das amostras enriquecidas com CMP, para os testes de recuperação.

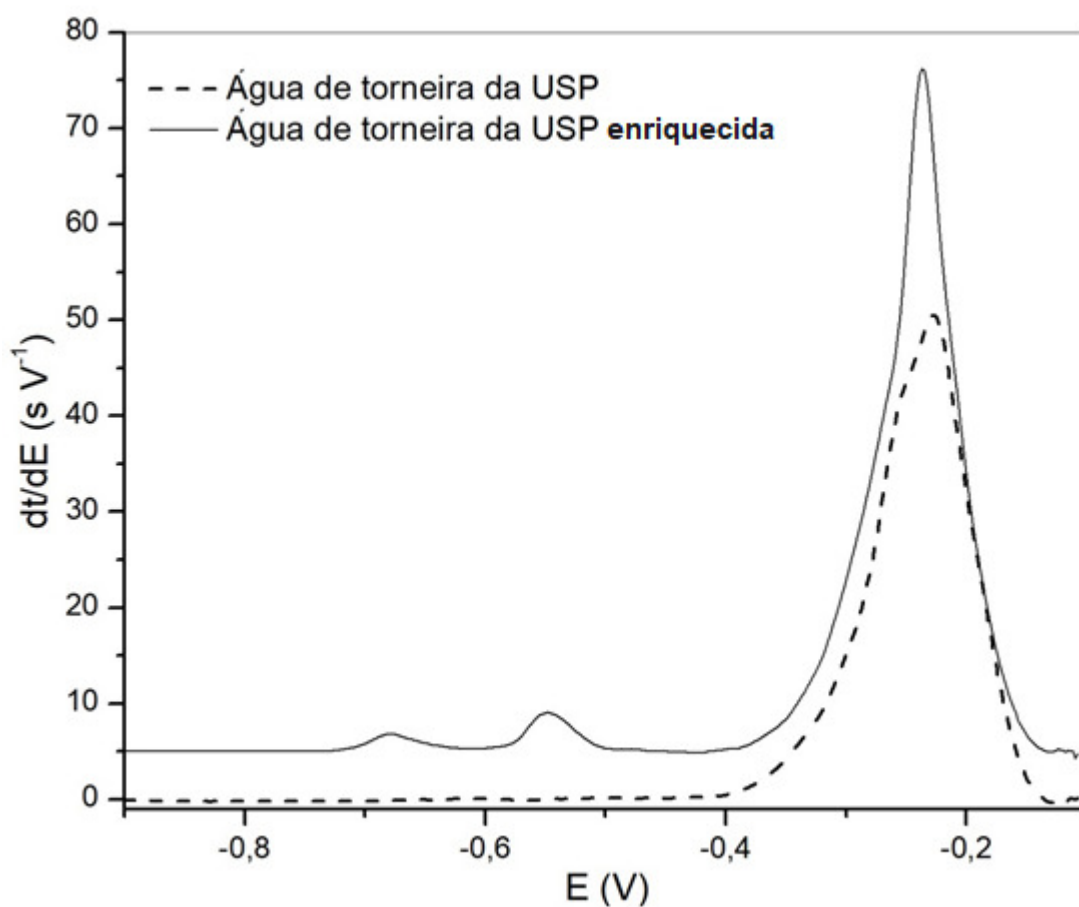


Figura 34: Cronopotenciogramas subtraídos do branco de amostra de água de torneira coletada no Instituto de Química da USP e a mesma amostra após ser enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $33 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} . Cronopotenciogramas foram obtidos após carregamento de $1500 \mu\text{L}$ das amostras na coluna de poli(GMA-co-EDMA)-IDA, e eluição com $300 \mu\text{L}$ de HNO_3 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl sob vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial de deposição: $-1,0 \text{ V}$, potencial final: $-0,1 \text{ V}$, Corrente de oxidação: $2 \mu\text{A}$

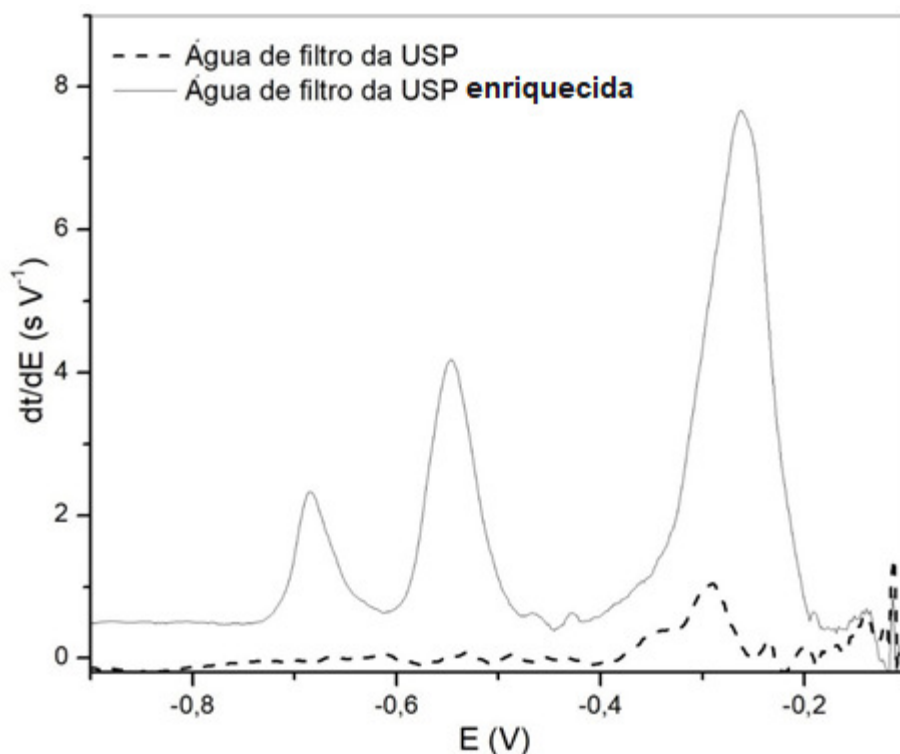


Figura 35: Cronopotenciogramas subtraídos do branco de amostra de água de filtro coletada no Instituto de Química da USP e a mesma amostra após ser enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $33 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} . As condições experimentais são descritas na legenda da Figura 34

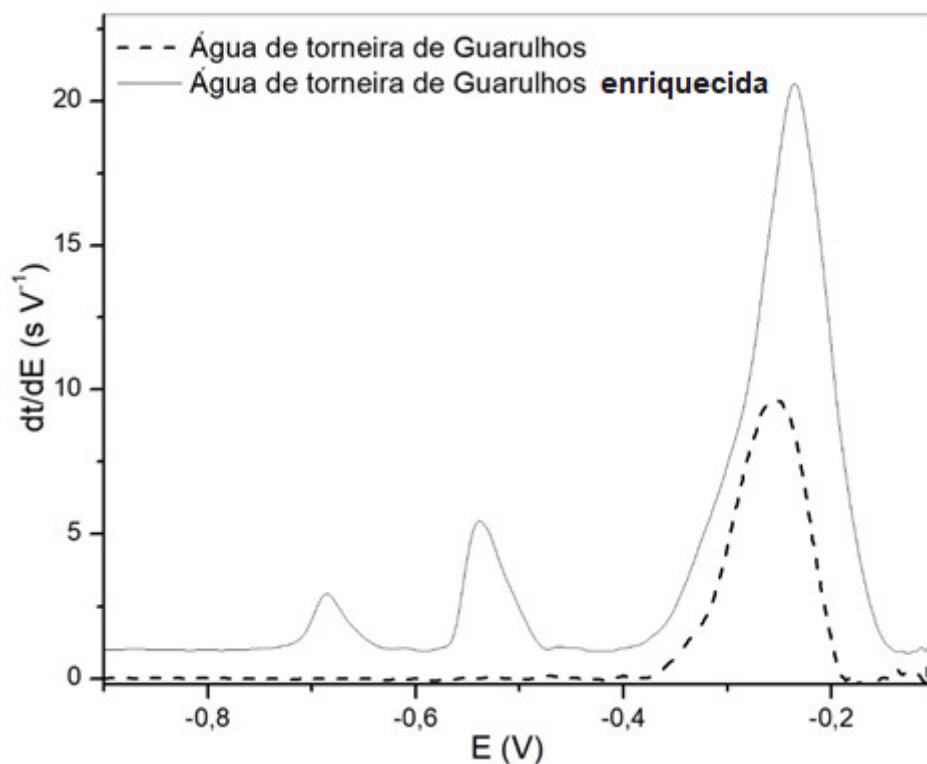


Figura 36: Cronopotenciogramas subtraídos do branco de amostra de água de torneira coletada município de Guarulhos/SP e a mesma amostra após ser enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $33 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} . As condições experimentais são descritas na legenda da Figura 34

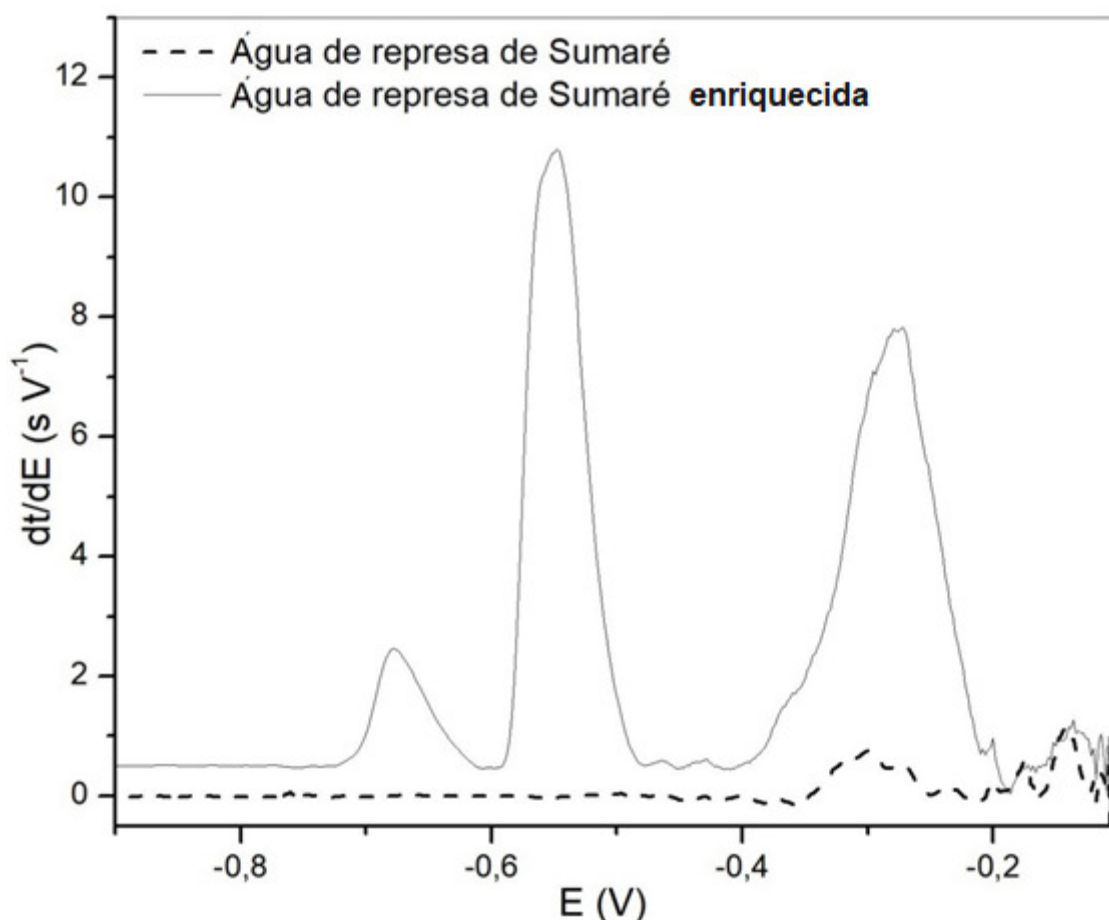


Figura 37: Cronopotenciogramas subtraídos do branco de amostra de água de represa coletada no município de Sumaré/SP e a mesma amostra após ser enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , $33 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} . As condições experimentais são descritas na legenda da Figura 34

Os resultados das concentrações encontradas juntamente com os valores de recuperação estão sumarizados na Tabela 6. Foi encontrado cobre em alta concentração na água de torneira coletada na USP, como pode ser visto no cronopotenciograma pontilhado (obtido com a amostra original) da Figura 34, um grande pico na região de $-0,3 \text{ V}$ referente ao cobre. A presença desse metal era esperada, porque CuSO_4 é constantemente usado para controle populacional de algas na represa Guarapiranga, reservatório que fornece água para a região da universidade [91], confirmando resultados obtidos em estudos anteriores por voltametria de onda quadrada e redissolução anódica [92]. Nossos resultados demonstraram que o tratamento de água do município de São Paulo não conseguiu remover completamente o Cu^{2+} da água de

torneira originária da represa Guarapiranga. Por outro lado, a mesma água após passar por filtração convencional em filtro doméstico de carvão ativado teve a concentração de Cu^{2+} diminuída a valores abaixo do LD do método, como pode se ver da Figura 35. A água de torneira coletada em Guarulhos apresentou uma concentração mensurável de Cu^{2+} , mas numa concentração menor do que aquela observada para a amostra coletada na USP. Isso também era esperado, já que essa água é fornecida pelo sistema Cantareira que é menos suscetível a floração de algas, e necessita de menor concentração de Cu^{2+} . A água de represa de Sumaré não exibiu nenhuma concentração detectável de Pb^{2+} ou Cd^{2+} ou concentração mensurável de Cu^{2+} , assim como a água retirada do filtro da USP. Os testes de recuperação mostraram recuperações entre 75,5 e 117,3 %, indicando que o método proposto fornece resultados exatos em matrizes aquosas de diferentes origens. Durante as análises nenhuma amostra levou ao entupimento da coluna ou dos canais do sistema SIA, demonstrando que os poros do monolito e o diâmetro dos canais eram largos o bastante para permitir a extração em fase sólida on-line das amostras sem necessidade de tratamento prévio, com exceção da amostra de água da represa que necessitou de filtragem off-line em filtro de 0,45 μm de poro, porque continha muitas impurezas macroscópicas, como lascas de madeira.

Tabela 6

Concentrações encontradas em amostras de água (n=3) e recuperação dos metais após reforçar as amostras com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd^{2+} , 33 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} e 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+}

Amostra	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)
Água de torneira (USP) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	95 ± 4
Recuperação (%)	94,4	98,0	104
Água de filtro (USP) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	-
Recuperação (%)	89,6	97	75,5
Água de torneira (Guarulhos) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	16 ± 2
Recuperação (%)	82	87,5	117,3
Água de represa (Sumaré) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	-	-
Recuperação (%)	116,6	110,2	107,5

2.5. CONCLUSÃO

Com esse trabalho foi possível demonstrar a viabilidade de SPE de metais usando como suporte sólido uma coluna monolítica polimérica acoplada no SIA, um sistema de fluxo de baixa pressão mas que foi compatível com a pressão da coluna monolítica após a mesma ter a composição manipulada para atingir a permeabilidade desejada. O monolito base de poli (GMA-co-EDMA) teve o grupo epóxi modificado com agente quelante IDA para retenção seletiva de metais e depois liberação dos mesmos com diminuição do pH pela ação da solução eluente, pré-concentrando os mesmos, e apresentou alta robustez e pouco efeito de memória. O uso de monolitos poliméricos rígidos e altamente reticulados modificados com IDA contornou as dificuldades de se obter uma coluna estável feita com essa resina, que apresenta grande variação de volume com mudanças no pH.

Apesar da capacidade relativamente baixa da coluna preparada, que priorizou permeabilidade acima de densidade de sítios complexantes, as curvas analíticas preparadas com metais individuais ou em mistura resultaram em inclinações parecidas, indicando que não havia competição dos analitos pelos sítios de adsorção da coluna. O método proposto pode ser aproveitado para automatizar métodos de detecção óptica como espectrofotometria de absorção molecular ou absorção atômica com atomização em chama, que não têm efeitos de pré-concentração inerentes ao método como métodos eletroquímicos de redissolução e dependem de algum tipo de pré-concentração acoplado para aumentar a sensibilidade.

CAPÍTULO 3: SEPARAÇÃO DE PRECURSORES E METABÓLITOS DA DOPAMINA POR NANOCROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA UTILIZANDO COLUNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS DE DIEDMA-MEDSA MODIFICADAS COM GRUPO FUNCIONAL POR UV GRAFTING

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Análise de Neurotransmissores

Neurotransmissão é a comunicação química controlada por moléculas pequenas, chamadas neurotransmissores, que viajam pela fenda sináptica para transmitir informação desejada para outros neurônios [93]. Catecolaminas são neurotransmissores importantes, entre os quais estão Dopamina (DA), Norepinefrina (NE) e Epinefrina (E), que exercem um papel crucial na regulação do sistema nervoso e cardiovascular e estão envolvidos em alguns comportamentos cerebrais, como estresse, pânico, ansiedade, e depressão [94]. Mudanças nas concentrações de catecolaminas em organismos são relacionadas com algumas desordens neurológicas e certas doenças. Além disso, existem muitos metabólitos em toda a metabolômica de catecolaminas, e a determinação da concentração dos metabólitos em conjunto com a concentração dos neurotransmissores pode fornecer informação importante sobre o grau de avanço da doença e efeitos do tratamento. Por exemplo, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor da DA, é usado como um tratamento efetivo para Doença de Parkinson quando o indivíduo sofre com a falta de DA, porque L-DOPA é facilmente convertido à DA por uma reação de descarboxilação [94]. A DA por sua vez é precursora da NE e E (Figura 38) [97]. NE e E podem ser usados como biomarcadores no estudo de diabetes, doenças do coração e ansiedade. A medição de Normetanefrina e Metanefrina, metabólitos da NE e E, respectivamente, é um método útil para detectar feocromocitomas (tumores em glândulas supra renais). Então, a determinação de uma

série de metabólitos de uma rota metabólica de catecolaminas em amostras biológicas é de grande importância [94,95].

Catecolaminas são definidas pela presença de um grupo catecol (benzeno com dois grupos hidroxila vizinhos) ligado a uma monoamina. Tirosina não é uma catecolamina, mas é um aminoácido proteinogênico, que possui um grupo fenol, e é precursor das catecolaminas (Figura 38). Tiramina (TIR) é um derivado da Tirosina, pela sua descarboxilação promovida pelo L-Aminoácido aromático descarboxilase (AADC), e também pode ser precursor da DA, através da oxidação do anel aromático promovida pela isoforma CYP2D6 do citocromo humano P450, presente no fígado e cérebro de humanos, embora essa seja uma rota minoritária de formação da DA a partir da tirosina, já que a rota majoritária é através da formação do L-DOPA pela Tirosina Hidroxilase (TirOH) e posterior descarboxilação com AADC (Figura 38) [97]. Como mostra a Figura 38, catecolaminas são metabolizadas e desativadas por duas enzimas, catecol-o-metiltransferase (COMT) e monoamina oxidase (MAO), levando a uma série de metabólitos, entre eles o Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o Ácido Homovanílico (HA). Na Figura 38, os neurotransmissores, precursores e metabólitos relevantes para esse trabalho foram contornados por um retângulo.

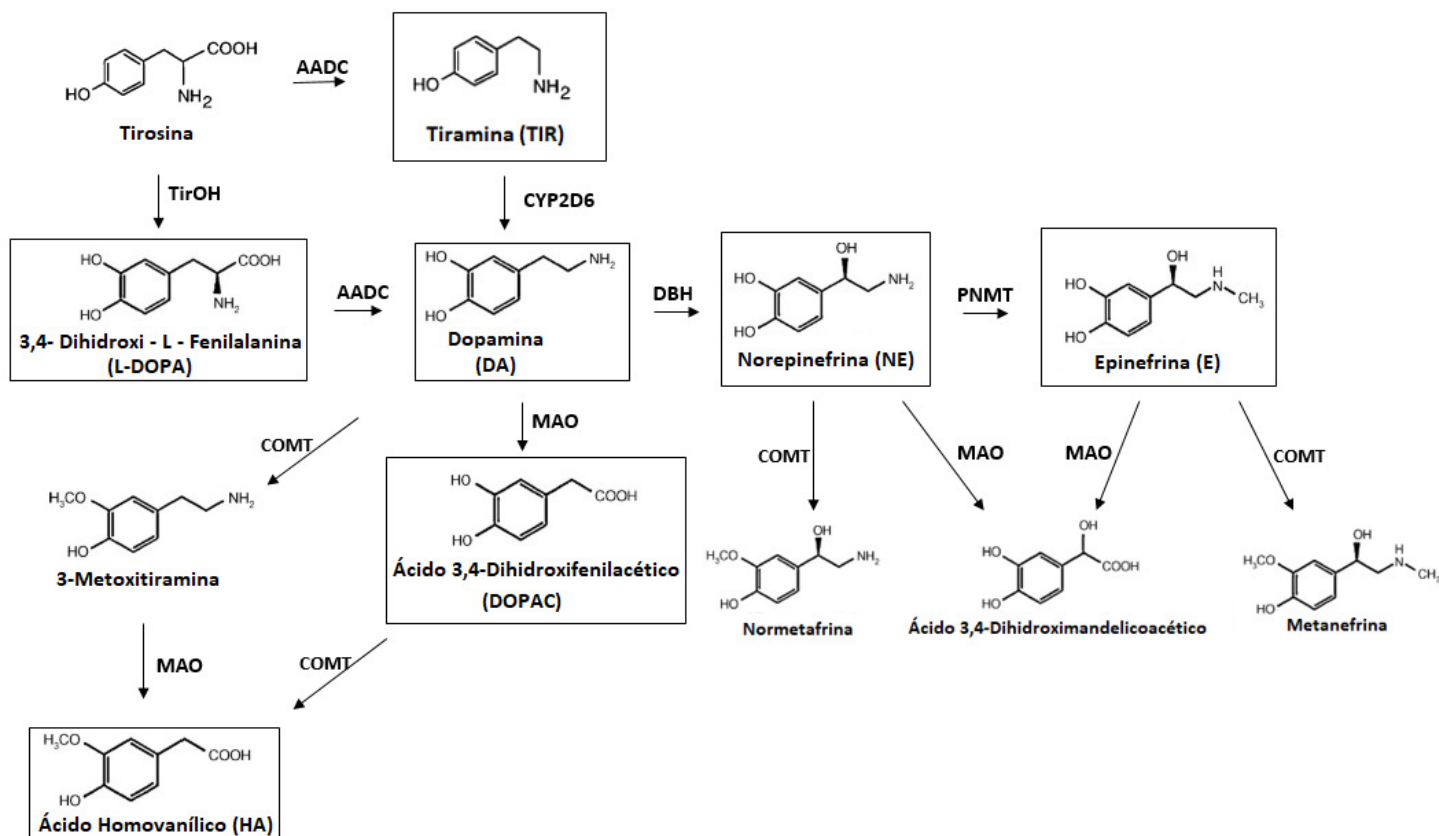


Figura 38: Caminhos para biosíntese e metabolismo das catecolaminas. TirOH = Tirosina Hidroxilase, AADC = L-Aminoácido aromático descarboxilase, DBH = Dopamina β -Hidroxilase, PNMT = Feniletanolamina N-metiltransferase, COMT = Catecol-o-metiltransferase, MAO = Monoamina Oxidase [96, 97]

A estrutura do anel aromático de catecolaminas torna esses compostos naturalmente fluorescentes, sensíveis à luz e facilmente oxidáveis. HPLC com detecção eletroquímica é o método mais frequentemente usado na quantificação de catecolaminas e seus derivados, pela alta seletividade e sensibilidade, embora também sejam utilizadas Cromatografia a Gás e Eletroforese Capilar na separação e outros tipos de detecção, com vantagens e desvantagens distintas [98, 99]. A detecção por fluorescência também é bastante usada, pois catecolaminas têm fluorescência nativa. Entretanto essa fluorescência é dificilmente aplicada em amostras reais porque a emissão é de comprimento de onda curto (320 nm), que é obstruído por emissões de componentes endógenos [98]. A derivatização com algum agente químico fluorescente como trihidroxiindol ou etilenodiamina combinado com uso de HPLC é bastante comum, e a

detecção por quimioluminescência após derivatização é mais sensível e seletiva do que detecção por luminescência nativa, mas requer uma etapa de tratamento pré-coluna demorada com agentes potencialmente tóxicos [98]. A detecção por MS recebe bastante destaque devido à informação estrutural que é obtida dos analitos, mas é relativamente a mais cara. A detecção por absorção de luz UV é um método de detecção bastante difundido em conjunto com HPLC pela simplicidade, mas é menos sensível do que a detecção por fluorescência ou eletroquímica [100]. A detecção eletroquímica é a mais usada porque catecolaminas são facilmente oxidadas e convertidas a quinonas, tornando a detecção sensível e seletiva sem necessidade de derivatização, mas a adsorção de interferentes na superfície do eletrodo de trabalho pode diminuir a sensibilidade [98, 100]. Esses métodos de determinação, quando aplicados diretamente, sem pré-concentração, têm detectabilidade limitada pela baixa concentração fisiológica das catecolaminas e também pela complexidade das matrizes biológicas. Então, para aumentar a sensibilidade e a seletividade, métodos de pré-concentração e preparo de amostra devem ser utilizados [101].

3.1.2. Separações cromatográficas de compostos polares

Catecolaminas e similares são compostos polares e ionizáveis. Apesar de compostos polares poderem ser separados por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC, *reverse phase liquid chromatography*), as catecolaminas são muito pouco retidas nas fases estacionárias apolares. Então a separação simultânea de múltiplas catecolaminas de estrutura química parecida e seus precursores e metabólitos se torna difícil [102].

Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) é um técnica cuja seletividade pode ser complementar à RPLC,

muito usada na separação de compostos polares, fracamente ácidos ou básicos e foi apresentada pela primeira vez por A.J. Alpert [107]. Na cromatografia HILIC uma fase estacionária polar é usada em combinação com fases móveis binárias aquosas-orgânicas com alta porcentagem de solvente orgânico (Acetonitrila) e baixa porcentagem de água [103]. Isso faz com que a água, em menor quantidade do que o solvente orgânico, esteja muito mais atraída pela coluna do que pelo interior da fase móvel, formando uma camada enriquecida de água na superfície da fase estacionária. Então os analitos polares sofrem partição entre a fase móvel (composta de acetonitrila e água) e água imobilizada na superfície da fase estacionária, por onde acessam com facilidade os poros e interagem com os grupos polares da coluna, sendo fortemente retidos por ligações hidrogênio, troca iônica ou dipolo-dipolo [102, 109]. Consequentemente a quantidade de analitos na fase móvel é muito menor do que a quantidade adsorvida na fase estacionária, resultando em alta retenção de compostos polares [103, 102]. O uso de HILIC para separações de catecolaminas é bastante citado na literatura [99, 107, 108], como no estudo de Sardella et al. em que eles estudaram a separação de DA e alguns de seus metabólitos empregando uma coluna para o modo RP e uma para o modo HILIC com detecção UV, obtendo perfis de seletividade diferente com os dois modos [99].

Vários tipos de colunas foram usadas no modo HILIC para separação de peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e compostos naturais: sílica não modificada e grupos polares ligados a superfície de sílica como amino, amido, carbamato, diol, poliol, poli (2- sulfoetil aspartamida) ou grupos zwitteriônicos, como a sulfoalquilbetaína N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA) (Figura 39 a.), que tem o grupo amônio quaternário carregado positivamente e grupos sulfônicos carregados negativamente [103, 104, 117]. As propriedades cromatográficas de materiais zwitteriônicos diferem significativamente dos outros

materiais iônicos ou de troca iônica ligados na superfície da sílica ou suporte de polímero, porque a camada ativa contém ambas as cargas positivas e negativas separadas por uma pequena cadeia carbônica, e como os dois grupos carregados com cargas opostas estão em proporção 1:1, existe uma carga total muito baixa. Como resultado, a interação dos grupos zwitteriônicos com os analitos polares é fracamente eletrostática, combinada com a alta eficiência e seletividade das interações hidrofílicas [117]. Apesar da baixa atração eletrostática, sulfoalquilbetaínas adsorvem fortemente a água por ligações hidrogênio, formando a camada de água na superfície da fase estacionária que tem papel central no funcionamento do mecanismo HILIC [109].

Outro grupo zwitteriônico bastante utilizado em cromatografia é o das fosforilcolinas (Figura 39 b.). Em comparação com sulfoalquilbetaínas elas possuem o grupo amônio quarternário carregado positivamente e o grupo fosfato negativo, com arranjo espacial de cargas opostas, o que pode resultar em características diferentes na cromatografia HILIC [117]. A 2- metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) e a MEDSA (Figura 39) são derivados com grupo metacrilóil-oxietil. Por serem de cadeia curta, podem ser usados como monômeros zwitteriônicos para cromatografia HILIC em colunas polares monolíticas a base de metacrilatos. Para a cromatografia HILIC o tamanho da cadeia carbônica deve ser curto para não aumentar a hidrofobicidade da superfície [117].

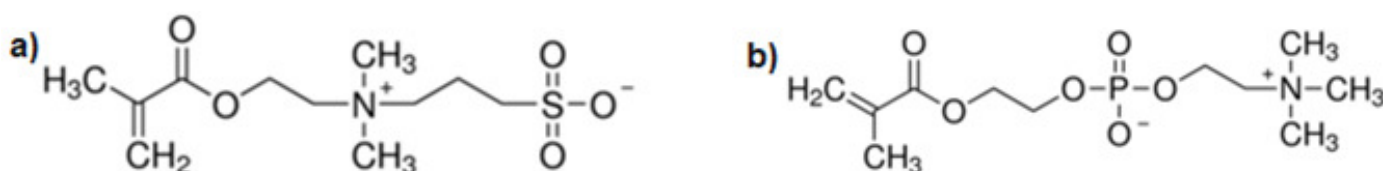


Figura 39: Estrutura da grupos zwitteriônicos usados em cromatografia HILIC.
a) sulfoalquilbetaína MEDSA: N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína b) MPC: fosforilcolina 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina

A cromatografia HILIC é considerada como o melhor método de separação para ser combinado com espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS), que se tornou o detector padrão em muitos campos analíticos como análises clínicas e aplicações bioanalíticas [116]. Os eluentes ricos em acetonitrila típicos de HILIC ajudam na formação do spray e melhoram a eficiência de ionização, levando a um ganho de sensibilidade. Extratos orgânicos de amostras, sobrenadantes de precipitação de proteínas e eluatos de extração em fase sólida podem ser injetados diretamente em sistemas HILIC, enquanto na RP a evaporação e reconstituição em outro solvente é necessária, então são eliminadas etapas demoradas de preparo de amostra ao usar o modo HILIC acoplado com ESI-MS [116].

3.1.3. Seletividade em cromatografia HILIC

Os testes de seletividade cromatográficos caracterizam o sistema de separação completo, não somente a fase estacionária, mas também a fase móvel. Em fases móveis aquosas-orgânicas, as interações polares são as principais no modo de separação HILIC, mas interações solvofóbicas (interações dos grupos apolares do analito com a fase estacionária se o solvente não for suficientemente apolar) também podem contribuir para a retenção. O mesmo ocorre no modo RP, em que alguma parte da retenção é devido à interação com grupos funcionais polares. Então, para muitos sistemas, a retenção total pode ser dividida entre contribuição do mecanismo HILIC e contribuição do mecanismo RP. [109].

O fator que distingue se um mecanismo é RP ou HILIC é a polaridade relativa entre fase móvel e fase estacionária. Ao usar fases móveis de diferentes polaridades, mecanismos duplos de retenção, em que efeitos RP e HILIC contribuem simultaneamente para a retenção, comumente ocorrem na cromatografia de compostos

polares em muitas fases estacionárias quimicamente ligadas. Em sistemas RP com fases móveis binárias aquosas-orgânicas, a retenção diminui conforme a concentração do solvente menos polar (acetonitrila) aumenta, enquanto no modo HILIC a retenção diminui com o aumento da concentração do solvente mais polar (água). Conseqüentemente, no gráfico de fator de retenção versus fração de volume de água (k vs ϕ_{H_2O}), um mínimo de retenção no ponto mais baixo de uma curva em “forma de U” corresponde à transição do mecanismo RP para HILIC [109].

Para alguns compostos o mínimo da curva em “forma de U” é bem baixo. O formato e ponto mínimo da curva em “forma de U” são altamente dependentes da polaridade do analito e da fase estacionária, portanto a caracterização deve ser feita para cada analito, podendo ser esperados diferentes curvas de retenção no gráfico k vs ϕ_{H_2O} , assim como diferentes composições de fase móvel que correspondem ao ponto mínimo [109].

Algumas equações de retenção foram propostas para descrever sistemas cromatográficos de mecanismo duplo de retenção HILIC e RP, que são importantes para a predição e otimização desses sistemas [103, 109, 110]. Um modelo bastante difundido é o apresentado na Equação 3, que descreve os efeitos da fração do volume de água como solvente polar sobre os fatores de retenção numa ampla faixa de composição do solvente aquoso-orgânico ($<0,02 \phi_{H_2O}$) [103, 109].

$$\log k = a_1 + m_{RP} \cdot \phi_{H_2O} - m_{HILIC} \cdot \log \phi_{H_2O} \quad (3)$$

Em concentrações de água menores que 2% o mecanismo é quase totalmente HILIC e o tempo sofre um aumento maior do que o previsto pela equação. O parâmetro m_{RP} caracteriza o aumento do fator de retenção pelo efeito do aumento da concentração

de água na fase móvel devido ao mecanismo RP em fases móveis ricas em água, enquanto m_{HILIC} corresponde à contribuição de água para a diminuição da retenção em fases móveis altamente orgânicas (mecanismo HILIC). A constante do sistema, a_1 , depende do soluto e do tipo do solvente orgânico. A Equação 3 é semi-empírica e descreve a curva em forma de U sobre a qual pontos experimentais comumente se encaixam no gráfico $\log k$ vs $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$, e com ela é possível achar o ponto mínimo da curva em função da composição de água ($\phi_{\text{min}} = 0,434 m_{\text{HILIC}} / m_{\text{RP}}$) [103].

Jandera e Stanková estudaram o efeito da composição da fase móvel, preparada offline com diferentes concentrações de acetonitrila, na retenção e separação de sulfonamidas em colunas BIGDMA-MEDSA (BIGDMA = Bisfenol A Glicerolato Dimetacrilato) que apresentavam mecanismo de retenção duplo RP-HILIC, e obtiveram os parâmetros da Equação 3 para cada analito com regressão não linear dos dados experimentais, plotando as curvas no gráfico $\log k$ vs $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ (Figura 40).

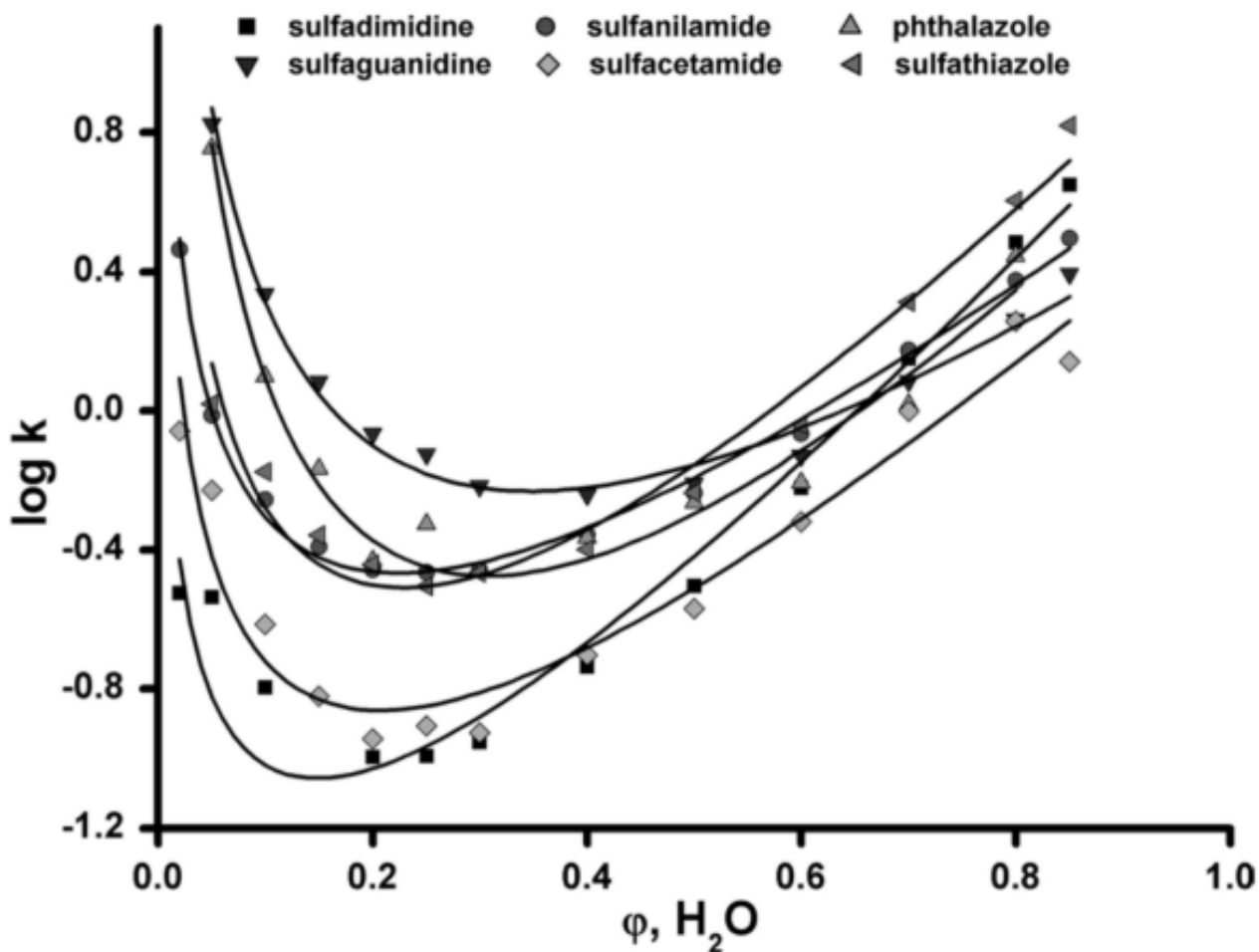


Figura 40: Efeito da fração de volume de água, ϕ_{H_2O} , em fases móveis aquosas-orgânicas sobre os fatores de retenção, k , de sulfonamidas em colunas monolíticas BIGMA-MEDSA. Faixa de composição de acetonitrila: 15-98% [103]

As sulfonamidas foram retidas pelo mecanismo HILIC (baixo ϕ_{H_2O}) e pelo mecanismo RP (alto ϕ_{H_2O}), sendo que os mínimos das curvas em “forma de U” ficaram entre 0,15 e 0,35 ϕ_{H_2O} . A separação com fase móvel composta de 90% ACN e 10% H_2O (Figura 41.a) mostra separação de cinco dos seis analitos no mecanismo HILIC, com sobreposição dos picos 2 e 6 (Sulfanilamida e Sulfatiázol). No mecanismo RP, a separação com fase móvel 40% ACN e 60% H_2O promoveu a separação parcial das sulfonamidas (Figura 41.b), com coeluição dos picos 1 e 3 (Sulfadimidina e Ftalazol).

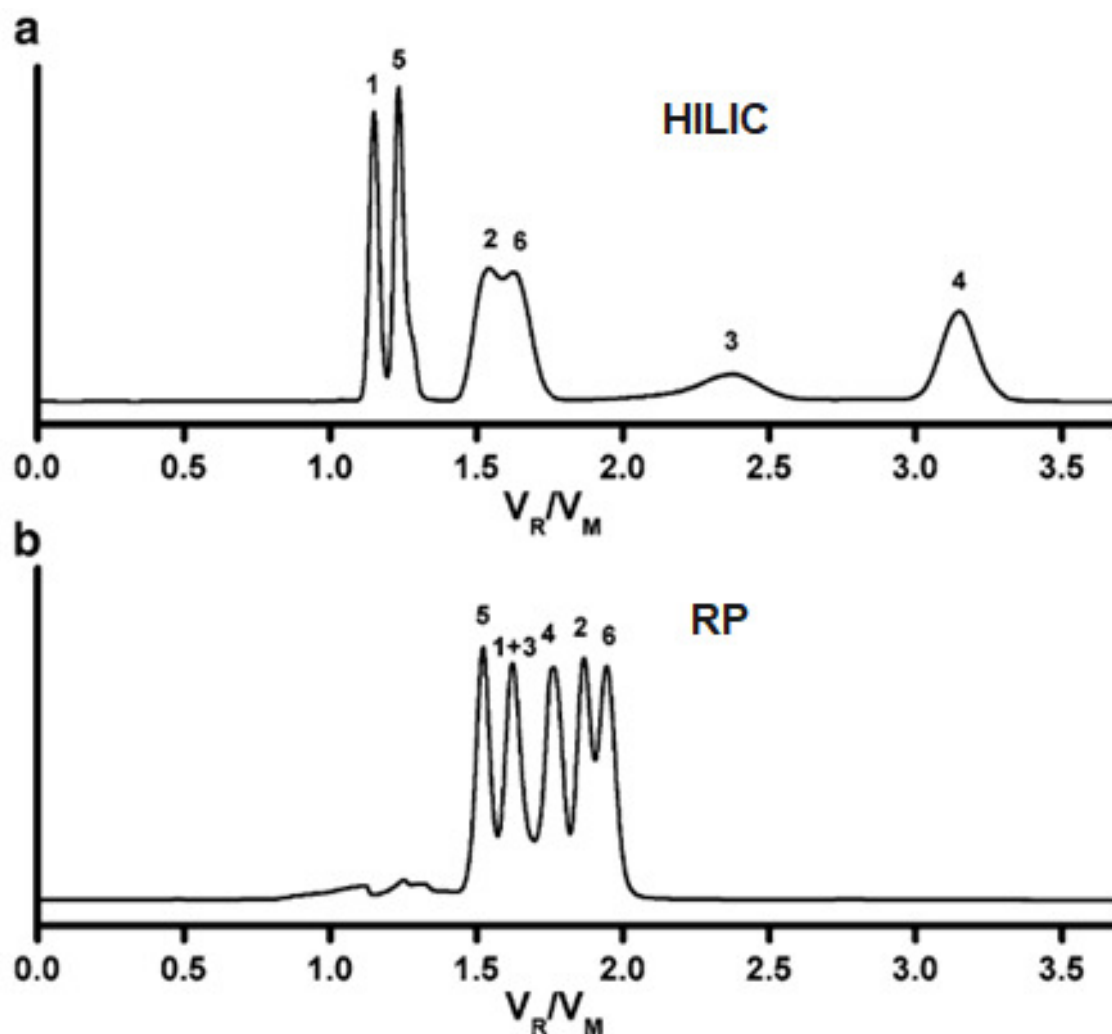


Figura 41: Separações de sulfonamidas na coluna BIGDMA-MEDSA. $l=167$ mm, $id=320$ mm, **a)** 90% ACN, 10% H_2O , $4,2 \mu L \text{ min}^{-1}$, $p=2,9$ MPa. **b)** 40% ACN, 60% H_2O , $3,6 \mu L \text{ min}^{-1}$, $p=8,1$ MPa. UV detection at 214 nm. (1) Sulfadimidina, (2) Sulfanilamida, (3) Ftalazol, (4) Sulfaguanidina, (5) Sulfacetamida, (6) Sulfatiazo [103]

As separações obtidas na Figura 41 podem ser consideradas complementares, pois os analitos 1 e 3, que coeluem no modo RP podem ser separados no modo HILIC, e os analitos 2 e 6 que são sobrepostos no modo HILIC apresentam maior separação no modo RP [103].

As separações em sistemas RP e HILIC geralmente são complementares porque a retenção nos dois modos é controlada por mecanismos diferentes que seguem direções opostas, isso é, em sistemas HILIC a retenção aumenta com o aumento da polaridade da amostra, enquanto no modo RP a retenção diminui com o aumento da polaridade da

amostra, o que resulta na diferença dos tempos de retenção dos dois modos. Frequentemente colunas HILIC e RP são acopladas on-line em métodos de cromatografia bi-dimensional (LC-LC) [111, 116], que utilizam a diferença de seletividade e padrão de retenção diferentes dos dois modos cromatográficos, para que utilizando-os em conjunto, possam ser separadas misturas de analitos complexas que não conseguiriam ser separadas somente por apenas um modo cromatográfico. A abordagem de Jandera e Stanková foi chamada pelos autores de cromatografia bi-dimensional offline, pois ao contrário de existirem duas colunas acopladas on-line, a cromatografia bi-dimensional foi feita em uma única coluna com diferentes modos de retenção, e para isso a coluna foi colocada em fase móvel rica em acetonitrila para fazer a caracterização HILIC ou em fase móvel rica em água para fazer a caracterização RP. Com a informação obtida dos perfis de seletividade diferente dos dois modos é possível determinar todos os componentes desse grupo de analitos [103, 109, 111].

3.1.4. Cromatografia HILIC com monolitos poliméricos

Monolitos poliméricos ainda foram pouco explorados para separações HILIC [111], mas os relatos dessas aplicações vêm crescendo. A falta de estudos em que monolitos poliméricos foram aplicados no modo HILIC pode ser devido à menor disponibilidade comercial de monômeros hidrofílicos em comparação com monômeros hidrofóbicos, à baixa solubilidade de muito deles nos solventes porogênicos comumente utilizados, o que exige a otimização da composição da mistura de polimerização [115], e também à baixa capacidade de separação de moléculas pequenas devido à baixa porcentagem de mesoporos.

Entretanto, atualmente muitas estratégias podem ser usadas para manipular a estrutura porosa, e aumentar a proporção de mesoporos (assim como a área superficial)

de monolitos poliméricos para melhorar a performance na separação para moléculas pequenas, assim como foi explicado no item 1.4. do capítulo 1.

A porosidade, permeabilidade, seletividade e características de retenção de colunas monolíticas compostas de sulfobetáínas dependem da concentração do monômero zwitteriônico, do tipo e da concentração do monômero formador de ligação cruzada e da composição dos solventes porogênicos na mistura de polimerização [118]. Monômeros e formadores ligações cruzadas com cadeias alquílicas maiores aumentam a proporção de mesoporos nas colunas de polimetacrilato, resultando na melhoria da eficiência de separação para moléculas pequenas [118].

O efeito do formador de ligação cruzada foi avaliado por Stanková et al. [104]. Colunas compostas de MEDSA e formadores de ligação cruzada de diferentes tamanhos e polaridades foram sintetizadas e a eficiência de separação de analitos pequenos no modo HILIC foi maior para colunas compostas de dioxietileno dimetacrilato (DiEDMA) e Bisfenol A Glicerolato Dimetacrilato (BIGDMA). Essas colunas apresentaram alta reprodutibilidade das propriedades cromatográficas e repetibilidade a longo termo em experimentos repetidos. Eles concluíram que a polaridade do formador de ligação cruzada é mais importante do que o tamanho da cadeia carbônica para aumentar a proporção de mesoporos do monolito final, por que com o aumento da polaridade os formadores de ligação cruzada ajudam na solvatação do esqueleto monolítico e aumentam a acessibilidade das moléculas pequenas aos poros internos [104].

Um estudo foi feito com monolitos altamente apolares de poliestireno-co-divinil benzeno (PS-DVB) com introdução de uma camada monolítica zwitteriônica após reação de hiper-crosslinking, produzindo uma coluna capaz de separações em condições HILIC [119]. Colunas monolíticas com monômeros metacrilatos incorporados são mais

polares e facilitam a adsorção de solventes polares, o que facilita a formação da camada aquosa superficial para partição no mecanismo de retenção HILIC [118].

O preparo de monolitos é relativamente simples e pode ser explorado para preparar monolitos em série. Por exemplo, com o preparo de vários monolitos com porcentagens diferentes do monômero zwitteriônico MEDSA e composições diferentes de solventes porogênicos binários ou terciários na mistura reacional foi possível fazer um estudo da influência desses dois fatores na seletividade de separação de moléculas pequenas sob o modo HILIC [120].

A modificação por UV grafting permite otimizar o monolito e depois fazer o grafting do monômero hidrofílico na superfície do mesmo, contornando o problema da insolubilidade de monômeros polares em solventes porogênicos orgânicos apolares [18]. Outra característica é que, uma vez um monolito base é otimizado, vários monolitos podem ser rapidamente preparados em laboratório seguindo a mesma receita, resultando em colunas com pouca variação das propriedades morfológicas, mecânicas e de resistência ao fluxo. Então, monolitos parentais podem ser modificados com diferentes grupos hidrofílicos para avaliar somente o efeito da modificação com esse grupo na separação, já que as propriedades porosas dos monolitos vão ser as mesmas [105, 18]. Quando é necessário produzir essas colunas na escala micro, os monolitos poliméricos também têm a facilidade de dispensar o processo de empacotamento de partículas pequenas em diâmetros pequenos dos capilares, pois são obtidos com a polimerização *in situ* a partir dos precursores líquidos na mistura reacional. Outros problemas de colunas empacotadas também são contornados, como necessidade de filtros retentores, alta pressão e instabilidade da sílica em pHs extremos [115].

3.1.5. Sistemas miniaturizados de cromatografia

A miniaturização é uma tendência em várias áreas da ciência e tecnologia, especialmente na instrumentação de química analítica [122]. O conceito de diminuição das dimensões do sistema cromatográfico, inclusive da coluna de separação, levou ao surgimento de técnicas de cromatografia miniaturizadas como Cromatografia Líquida Capilar (CLC) e da Nanocromatografia Líquida (nano-LC). A nomeação dessas técnicas é feita de acordo com o diâmetro interno das colunas capilares e das vazões utilizadas. Quando capilares de diâmetro interno de 100 a 320 μm e vazão entre 1 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ são utilizadas a técnica é nomeada de CLC, enquanto quando os capilares têm diâmetro menor do que 100 μm e vazão entre 50 e 800 nL min^{-1} a técnica é nomeada nano-LC [121].

Ao fazer a cromatografia em tubos de dimensões reduzidas alguns benefícios são alcançados em relação à cromatografia convencional: O tempo de análise é menor, a quantidade de resíduo é drasticamente reduzida pelo baixo consumo de solventes e amostra e o sistema é facilmente acoplado à MS pela compatibilidade da vazão, que é menor [121]. Além disso, o diâmetro reduzido ajuda a evitar a dispersão da banda do analito na coluna de duas maneiras: diminui o volume de fase móvel em contato com a amostra, o que diminui a diluição do pico cromatográfico e limita a quantidade de caminhos preferenciais possíveis que o analito pode adotar dentro da coluna, diminuindo a contribuição dos caminhos múltiplos (coeficiente de difusão turbilhonar) na dispersão das bandas cromatográficas. Então, separações mais eficientes normalmente são obtidas. A sensibilidade, entretanto, não é considerada alta nos métodos capilares apesar da diluição de amostra em fase móvel ser baixa, devido ao volume de amostra injetado também ser baixo (10-60 nL) [122]. A redução do consumo

de solvente torna o custo menor, principalmente se a fase móvel for composta de solventes orgânicos caros, e esses métodos ambientalmente mais corretos [121].

Em CLC ou nano-LC, o volume extra-coluna deve ser reduzido para a eficiência de separação não ser comprometida pela dispersão da banda cromatográfica em outros componentes do sistema. Isso é feito ao empregar componentes do sistema (como bombas, tubos, conexões, colunas, injetor, celas de detecção) menores possíveis, que tenham volume interno pequeno, porque em cada conexão entre os componentes (injetor – coluna e coluna – detector) existe um volume morto relacionado que promove a dispersão de banda. A instrumentação é disponível comercialmente fornecida por alguns fabricantes; a fase móvel é operada em modo de eluição isocrática ou gradiente.

Bombas de sistemas convencionais frequentemente são adaptadas em laboratório para sistemas miniaturizados com o uso de um adaptador (*flow splitter*) que divide o fluxo da bomba de HPLC convencional para o valor desejado, reduzindo a vazão da ordem de mL min^{-1} para $\mu\text{L min}^{-1}$ [121]. Quando a eluição é isocrática o *flow splitter* pode redirecionar o fluxo de fase móvel que foi desviada (que não foi enviada para a coluna) de volta para o recipiente de fase móvel, o que diminui bastante o seu consumo. A

Figura 42 mostra um sistema de nanocromatografia montado em laboratório.

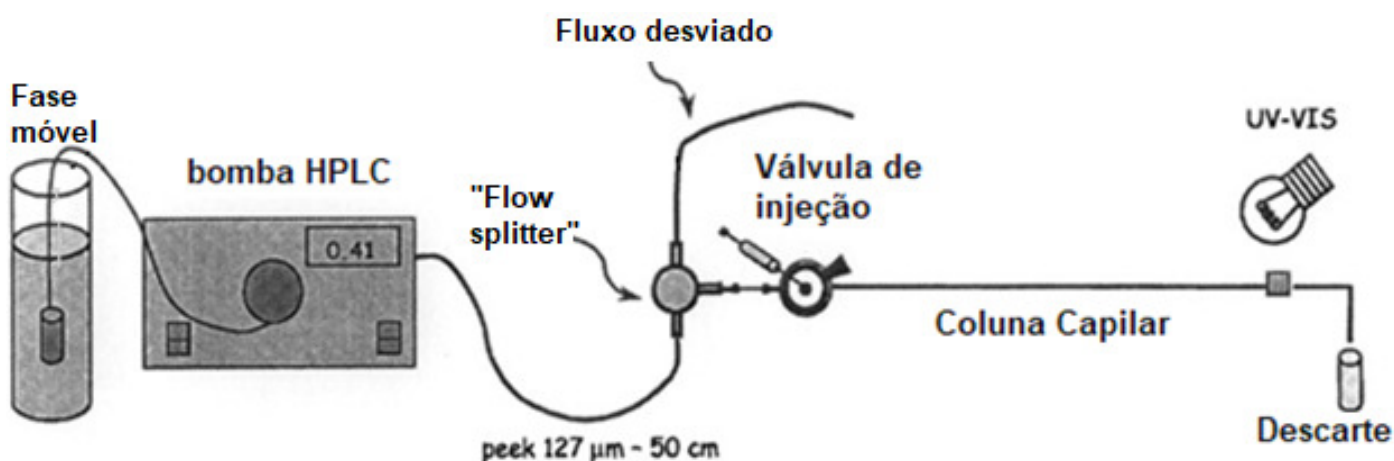


Figura 42: Instrumento de nano-LC montado em laboratório (Adaptado da Referência 121)

As colunas capilares mais usadas em CLC ou nano-LC são empacotadas com partículas baseadas em sílica com diferentes modificações químicas. Atualmente a viabilidade do uso de monolitos poliméricos como recheio de colunas capilares já foi demonstrado por diversos grupos de pesquisa, e são empregadas em muitas aplicações [121]. Como comentado algumas vezes nesse trabalho, os monolitos são melhores adaptados a colunas capilares do que partículas por dispensarem empacotamento, filtros retentores e resultarem em pressão baixa, mais compatível com sistemas miniaturizados. Com monolitos em colunas capilares, além da polimerização iniciada termicamente, ela pode ser foto iniciada por luz UV. Para isso, o tubo deve ser feito de material transparente para não impedir o acesso da luz ao iniciador radicalar fotossensível presente na mistura reacional, o que é feito ao usar capilares de sílica fundida recobertos de Teflon, em vez dos comumente utilizados, recobertos de poliimida [18]. Após a síntese, pode haver uma etapa de modificação por UV grafting para enxertar monômeros em setores delimitados da coluna com o uso de uma máscara UV para bloquear a luz em setores que não é desejado fazer a modificação. Os detalhes da modificação por UV grafting foram discutidos no item 1.4.5. do Capítulo 1.

3.2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a separação de alguns neurotransmissores, seus metabólitos e precursores (Dopamina, Epinefrina, Norepinefrina, L-DOPA, Tiramina, DOPAC e Ácido Homovanílico) em amostras sintéticas por Nanocromatografia líquida, feita com colunas poliméricas em formato capilar. As colunas eram baseadas em polimetacrilatos, compostas pelo monômero formador de ligações cruzadas dioxietileno dimetacrilato (DiEDMA) e monômero zwitteriônico funcional N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA), e apresentavam mecanismo de retenção hidrofílico (HILIC) ou de fase reversa (RP) de acordo com a composição da fase móvel binária aquosa-orgânica. Foi feita a caracterização cromatográfica da coluna em uma ampla faixa de composição da fase móvel aquosa-orgânica e avaliada a mudança de seletividade entre os modos, assim como a possibilidade de separação dos compostos pelo mecanismo duplo. Após a caracterização, a coluna foi modificada por UV grafting do monômero zwitteriônico 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) com o intuito de aumentar a densidade de sítios polares na superfície do monolito que participam dos processos cromatográficos e assim alterar a retenção e seletividade obtida com o monolito na cromatografia HILIC. As mudanças na retenção e na seletividade da coluna foram avaliadas teoricamente pelo modelo de retenção duplo e por dados experimentais.

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1. Materiais

Capilares de sílica fundida recobertos com Teflon[®] de diâmetro interno 100 µm foram obtidos da Agilent (Palo Alto, CA, USA). 3- (trimetoxisilil) propil metacrilato (MPTS), hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido trifluoroacético (TFA), 1,4-butanodiol e azobisisobutironitrila (AIBN) foram comprados da Fluka (Buchs, Suíça). 1-propanol, dioxietileno dimetacrilato (DiEDMA), N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA), benzofenona (BP), 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC), tolueno e metanol foram comprados da Sigma-Aldrich. Padrões de catecolaminas: dopamina, epinefrina, norepinefrina, L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), tiramina, ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA) na maior pureza disponível. Acetonitrila para a fase móvel do HPLC foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água desionizada redistilada foi usada para preparação de amostras e fases móveis.

3.3.2. Preparo das colunas capilares monolíticas de polimetacrilato

Primeiramente os capilares de sílica fundida foram lavados em sequência com acetona, água, NaOH 0,2 mol L⁻¹ por 30 minutos, novamente água até neutralizar o pH, então com HCl 0,2 mol L⁻¹ por 30 minutos, e finalmente com etanol. Então a superfície interna foi ativada com a purga da solução 40 % (v/v) de 3- (trimetoxisilil) propil metacrilato em etanol 95 % (com o pH ajustado para 5) durante 3 horas. O capilar foi finalmente purgado com etanol, seco com fluxo de gás N₂, e estabilizado por 24 horas em temperatura ambiente antes da polimerização.

As misturas de polimerização foram preparadas com a dissolução dos monômeros em misturas terciárias de solventes porogênicos que continham água. A mistura reacional foi composta de 20 % N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA), 15 % dioxietileno dimetacrilato (DiEDMA), 25% 1,4- butanodiol, 15 % água e 1% Azobisisobutironitrila (AIBN) em relação à massa de monômeros.

Os capilares de sílica fundida com as paredes internas modificadas foram preenchidos com a mistura de polimerização, ambas as extremidades foram seladas com tampas de borracha, e os capilares foram mantidos por 20 horas a 60° C em um termostato com ar circulado. Após a polimerização, ambas as extremidades foram cortadas, a coluna monolítica capilar foi lavada com acetonitrila e finalmente com fase móvel.

3.3.3. Modificação por UV grafting

O monolito base foi purgado com o fotoiniciador benzofenona na concentração 5% (m/m) em metanol sob vazão de 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 30 minutos. As extremidades do capilar foram seladas com tampas de borracha para prevenir o fluxo ou evaporação, e o capilar foi exposto à luz UV. Quando a coluna foi modificada pela metade uma máscara UV foi inserida na metade do comprimento da coluna para que a região escura não fosse modificada. Após o fotografting do iniciador sozinho, o monolito foi lavado com metanol na vazão de 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 20 minutos para remover o iniciador não enxertado. Em seguida uma solução 20% (m/m) de 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) em metanol foi purgada pela coluna sob a vazão de 0,5 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 30 minutos. A coluna foi então selada e exposta à radiação UV com diferentes tempos de exposição (10 ou 30 minutos) nas mesmas regiões que haviam sido previamente expostas na

primeira etapa. O monolito foi então lavado com água na vazão de $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$ por 60 minutos para remover o monômero hidrofílico não retido.

3.3.4. Instrumentação

As exposições UV foram feitas com o equipamento UVP CL-1000 Ultraviolet Crosslinker com o comprimento de onda de 254 nm (Analytik Jena, Upland, CA, USA). Soluções foram bombeadas pelos capilares usando bomba de seringa NewEra NE-4000 (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA).

Um sistema de Nanocromatografia líquida foi montado em laboratório a partir de (i) uma bomba de eluição isocrática de HPLC: SpectraSYSTEM P1000 fabricada pela Thermo Separation Products (Waltham, MA, USA); (ii) uma válvula “Flow splitter” QuickSplit™ (Analytical Scientific Instruments, Richmond, CA, USA); (iii) uma nanoválvula de injeção com um loop interno de amostra de 4 nL (Valco, Houston, USA) comutada eletricamente; (iv) um detector UV de comprimento de onda variável LCD 2083 usando uma cela de fluxo feita de um capilar de sílica fundida com de 50 μm diâmetro interno (ECOM, Praga, República Tcheca); (iv) um computador equipado com software cromatográfico Clarity Data para Windows (Data Apex, Praga, República Tcheca). As colunas capilares foram conectadas ao detector via junções capilares de volume zero feitas de PTFE.

3.3.5. Métodos

Soluções estoque de 1 mg mL^{-1} de cada soluto foram dissolvidas na fase móvel e diluídas a concentrações nas quais a resposta do detector fosse de intensidade adequada. Amostras de 4 nL foram injetadas em todos os experimentos. Fases móveis pré-misturadas compostas de acetonitrila e água com adição de TFA 0,1 % foram usadas em

experimentos isocráticos. Todas as fases móveis foram filtradas por um filtro 0,45 μm e degaseificadas antes do uso. A vazão da fase móvel foi ajustada na faixa de 0,25 a 1 $\mu\text{L min}^{-1}$, conforme apropriado, e foi controlada usando um cronômetro e uma microbureta calibrada de 100 μL .

O tempo de retardamento da fase móvel (t_M) foi determinado com a eluição do tolueno em acetonitrila 95%. Todos os experimentos cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente e repetidos pelo menos em triplicata. Os tempos de retenção e larguras de pico à meia altura nas fases móveis contendo de 5 a 95% de acetonitrila foram avaliados pelo software de análise de dados Clarity Data (Data Apex, Praga, República Tcheca) e usados para o cálculo dos fatores de retenção, $k = (t_R - t_M) t_M^{-1}$, e outras características da coluna.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Desenvolvimento da coluna monolítica polimérica zwitteriônica

Essa parte do trabalho foi realizada sob orientação do Professor Jirí Urban, na Faculdade de Ciências, Universidade Masarykova, Brno, República Tcheca. As colunas utilizadas nesse trabalho foram desenvolvidas pelo professor em trabalhos prévios [104, 120]. O desenvolvimento se deu em duas etapas: na primeira etapa foi otimizada a obtenção do monolito feito de MEDSA e EDMA para aplicação no modo HILIC de compostos polares [104]. Na segunda etapa o monômero formador de ligação cruzada do monolito previamente otimizado foi substituído no preparo da mistura reacional por outros metacrilatos formadores de ligação cruzada de diferentes tamanhos e polaridades [120].

No primeiro trabalho [104], colunas foram preparadas com diferentes proporções do monômero zwitteriônico (MEDSA) em relação ao monômero formador de ligação cruzada (EDMA), dissolvidos em misturas porogênicas compostas de 1,4-butanodiol, 1-propanol e água em diferentes proporções [104]. Nessa etapa os fatores importantes na otimização foram: (i) a porcentagem de MEDSA na composição, o que teve influência direta na eficiência de separação de compostos modelo (tolueno, uracila, tiourea e fenol), já que nas colunas feitas com maior porcentagem de MEDSA a eficiência foi maior e a permeabilidade foi menor (o que sugere uma maior proporção de mesoporos em relação a poros de fluxo nas colunas preparadas com maiores porcentagens de MEDSA); (ii) A composição da mistura porogênica, que deveria solubilizar a maior quantidade possível de monômero, já que quanto mais monômero pode ser solubilizado mais MEDSA pode ser incorporado na estrutura, garantindo assim uma fase estacionária mais polar para separações no modo HILIC. Além disso, a composição da mistura porogênica afeta os processos de separação de fase para prover

um monolito de suficiente permeabilidade [104]. Água foi usada em todas as misturas porogênicas porque foi observado que era essencial para solubilizar o MEDSA, que é um monômero pouco solúvel em fase orgânica, por isso as misturas de solventes porogênicos foram terciárias que continham água [104].

Os critérios para a escolha do monolito que serviu de base para a segunda etapa do desenvolvimento foram permeabilidade e eficiência suficientemente altas e alta retenção no modo HILIC. A mistura reacional composta de 20% MEDSA, 15% EDMA, 25% 1,4-butanodiol, 25% 1-propanol e 15% água foi a escolhida.

No segundo trabalho [120], o formador de ligações cruzadas EDMA usado na composição do monolito otimizado na primeira etapa foi substituído, colocando o monômero zwitteriônico MEDSA em combinação com vários metacrilatos formadores de ligação cruzada diferindo em tamanho e polaridade (Figura 43). A coluna composta de EDMA otimizada no primeiro trabalho também foi incluída no segundo trabalho [120].

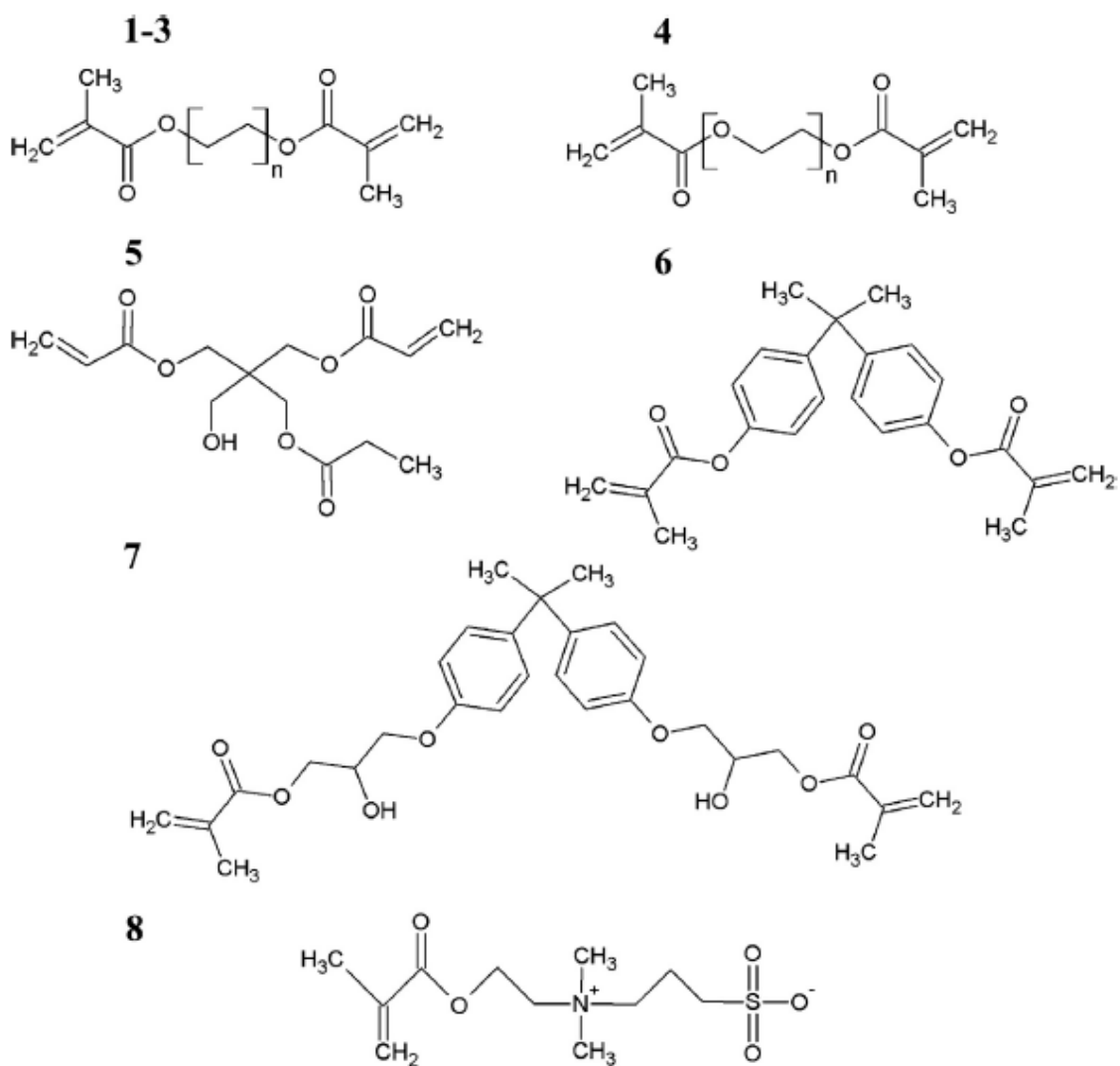


Figura 43: Estrutura dos monômeros metacrilatos formadores de ligação cruzada utilizados em conjunto com o MEDSA: (1) etileno dimetacrilato, $n=1$ (EDMA); (2) tetrametileno dimetacrilato, $n=2$; (BUDMA); (3) hexametileno dimetacrilato, $n=3$ (HEDMA); (4) dioxietileno dimetacrilato, $n=2$ (DiEDMA); (5) pentaeritrol triacrilato; (6) bisfenol A dimetacrilato (BIDMA); (7) bisfenol A glicerolato dimetacrilato (BIGDMA); (8) N,N-dimetil-N-metacrilóil-oxietil-N-(3-sulfopropil) amônio betaína (MEDSA) [120]

A razão da concentração do MEDSA (20%) em relação ao formador de ligações cruzadas (15%) foi mantida constante, e a mesma composição do solvente porogênico (25% propanol, 25% 1,4-butenodiol e 15% água) (+1% do iniciador azobisisobutironitrila) foram empregadas na polimerização iniciada termicamente, para

permitir a comparação direta das características porosas, eficiência, retenção e seletividade.

A Figura 44 mostra as imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) das colunas monolíticas de DiEDMA e BIGDMA, que forneceram as melhores separações no modo HILIC [120]. As colunas exibiram permeabilidade de $1,52 \times 10^{-14}$ (DiEDMA) e $2,88 \times 10^{-14}$ (BIGDMA), calculadas pela Lei de Darcy (Equação 2). A estrutura dos monolitos é bastante similar, mas a coluna de BIGDMA tem microglóbulos com formato mais regular [120].

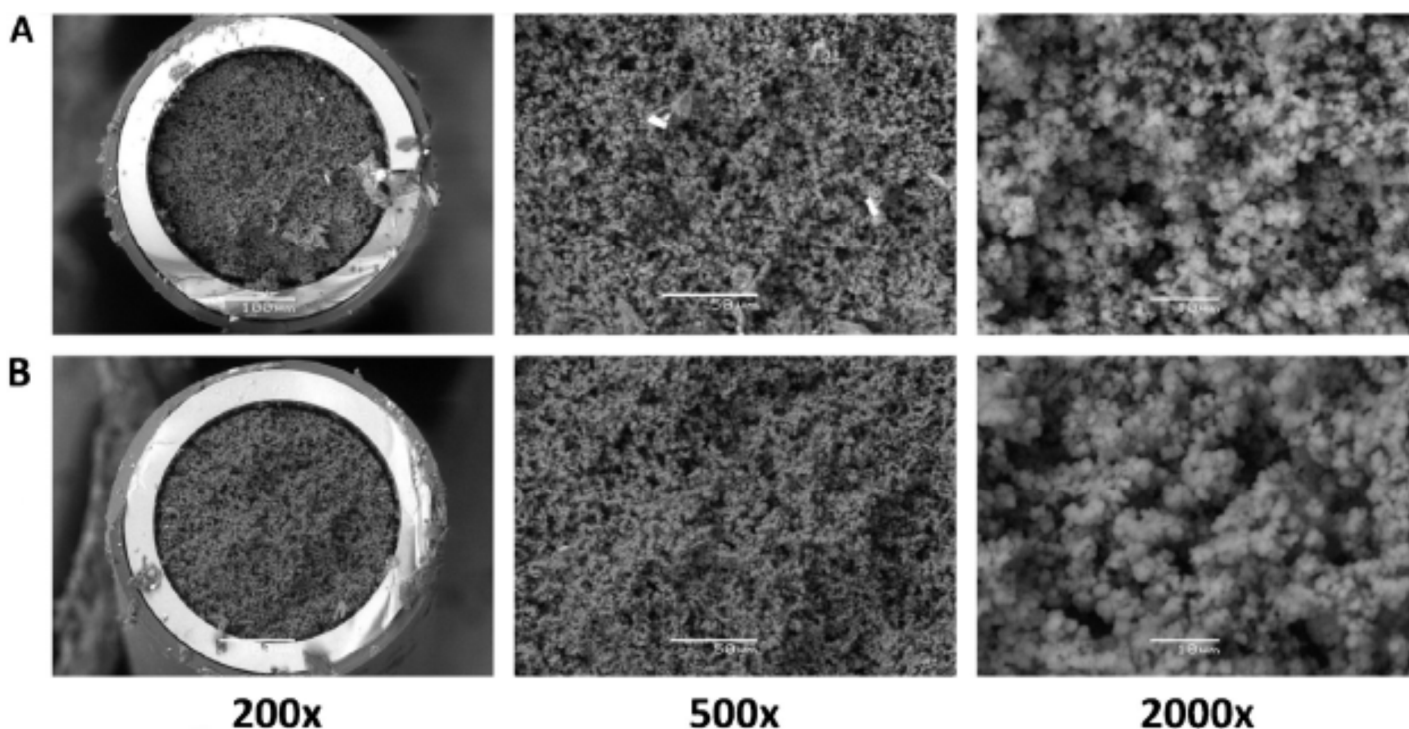


Figura 44: Imagens de MEV das colunas monolíticas preparadas com os monômeros formadores de ligação cruzada (A) dioxi-etileno dimetacrilato; (B) bisfenol A glicerolato dimetacrilato [120]

Os monolitos passaram por caracterização com estudos de curvas de exclusão de tamanho para determinar a porcentagem de mesoporos em relação à porcentagem de macroporos. Também foram caracterizados com relação à eficiência de separação de moléculas modelo de baixo peso molecular com diferentes polaridades (tolueno e fenol,

apolares; uracila e tiourea, bastante polares). Os monolitos plausíveis para separação de moléculas pequenas foram os compostos de DiEDMA e BIGDMA, que são monômeros polares (o grupo dioxietileno que é presente no DiEDMA e as hidroxilas do BIGDMA fazem a polaridade deles serem maiores do que os metacrilatos com grupos metilênicos ou aromáticos [120]). A maior polaridade desses monômeros foi relacionada como um fator influente no processo de transferência de fase no começo da polimerização (mais influente do que o tamanho da cadeia) e que levou à formação de maior quantidade de mesoporos do que os metacrilatos menos polares, conforme verificado pelas curvas de exclusão de tamanho. As colunas apresentaram mecanismo duplo de retenção RP-HILIC, e a eficiência de separação de tolueno, fenol, uracila e tiourea sob o modo HILIC foi maior para essas duas colunas do que para os monolitos análogos preparados com metacrilatos menos polares para formação de ligações cruzadas [120].

3.4.2. Aplicação da coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) na separação de neurotransmissores, seus metabólitos e precursores

Nos trabalhos em que a coluna foi otimizada, duas colunas compostas com DiEDMA e BIGDMA que exibiam mecanismo de retenção misto, foram caracterizadas e resultaram em separações HILIC eficientes de compostos polares de baixa massa molecular [104, 120]. A escolha da coluna composta de DiEDMA em preferência ao BIGDMA se deu porque o monômero BIGDMA é muito viscoso, sendo muito difícil pesá-lo apropriadamente.

A curva em “forma de U” obtida em colunas com mecanismo misto depende muito da polaridade do analito, sendo que analitos polares normalmente apresentam maior retenção no modo HILIC, e o mínimo da curva é mais próximo de altas concentrações de água [104]. A alta retenção no modo HILIC normalmente resulta em

maior capacidade de separação de analitos polares que são dificilmente separados por RP.

A coluna otimizada foi aplicada na separação por cromatografia HILIC de dopamina (DA), epinefrina (E), norepinefrina (NE), tiramina (TIR), ácido L- 3,4-fenilacético (L-DOPA), Ácido (DOPAC) e ácido homovanílico (HA), neurotransmissores, alguns de seus metabólitos e precursores, um grupo de analitos cuja separação ainda não havia sido experimentada com essa coluna. Em seguida o monolito poli(MEDSA-co-DiEDMA) foi modificado por UV grafting em duas etapas pela exposição do monolito (previamente modificado com iniciador benzofenona) à luz UV na presença do monômero zwitteriônico 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC), o que foi possível com o uso do capilar recoberto de Teflon para garantir transparência. Depois de feita a modificação foi avaliada a mudança nos perfis de seletividade e retenção pós-modificação, o que também é parte da inovação desse trabalho.

A modificação por UV grafting do MPC tem como objetivo aumentar a densidade de grupos zwitteriônicos na superfície do monolito. O monômero zwitteriônico MEDSA é usado na polimerização termicamente iniciada para constituir o interior do polímero e pode estar inacessível ao solvente, já com o UV grafting o monolito deve apresentar maior polaridade na sua superfície. A modificação por UV grafting foi feita de três maneiras: modificação da metade do comprimento da coluna (com o uso de uma máscara UV) durante 10 minutos (Coluna 2), modificação de todo o comprimento da coluna durante 30 minutos (Coluna 3) e modificação de metade do comprimento da coluna por 30 minutos (Coluna 4). As colunas utilizadas nesse trabalho receberam as nomeações assinaladas, além de Coluna 1, o monolito base não modificado. Ao serem conectadas no cromatógrafo, a extremidade modificada da coluna era conectada na entrada do fluxo.

Os fatores de retenção para os compostos foram determinados com as quatro colunas, alterando as fase móveis previamente misturadas em composições variáveis numa ampla faixa de concentração de acetonitrila aquosa (5-95%) para obter a curva em “forma de U” para cada composto e, através da regressão não linear dos pontos experimentais obtidos, encontrar os coeficientes a_1 , m_{RP} e m_{HILIC} que melhor ajustam os dados experimentais ao modelo de retenção mista HILIC-RP (equação 3) para cada composto. Alguns compostos eram muito retidos em concentrações altas de acetonitrila e, por isso, algumas curvas foram determinadas na faixa de 10–95% ou 15-95%. Em seguida foi feita a separação dos sete analitos em cada uma das colunas.

A Figura 45 mostra o efeito da composição da fase móvel sobre a retenção dos compostos no monolito base (Coluna 1), e em seguida a Tabela 7 contém todos os coeficientes encontrados para todas as colunas utilizadas nesse trabalho. Os pontos no gráfico representam os pontos experimentais e as linhas são as curvas obtidas pela regressão não linear. Para todos os analitos as curvas mostram o ponto mínimo típico do comportamento de retenção duplo, ou seja, diminuindo com aumento da concentração de água de 20 a 65 % na fase móvel (modo HILIC) e então aumentando a retenção com o aumento da concentração de água (modo RP). De maneira geral as medidas tiveram variações significativas do modelo, evidenciado pelos valores não muito altos dos coeficientes de correlação, provavelmente devido a desvios experimentais na faixa de altas concentrações de acetonitrila, em que a inclinação é muito alta. Entretanto a Figura 45 mostra que o modelo pode ser usado para estimar aproximadamente os efeitos da fase móvel sobre as retenções nos sistemas de mecanismo duplo HILIC-RP.

O ácido homovanílico (HA) é o mais retido sob o mecanismo RP e o menos retido no modo HILIC, enquanto dopamina, epinefrina, L –DOPA e norepinefrina são bastante retidos no modo HILIC e não apresentam aumento da retenção com aumento

de concentração de H₂O, o que ilustra a baixa contribuição de interações hidrofóbicas na retenção na faixa de fases móveis do modo RP. O DOPAC apresenta retenção tanto em altas concentrações de água como de acetonitrila, sugerindo que o composto tem caráter polar e apolar. Tiramina permanece relativamente pouco retida por toda faixa de concentração, com um pequeno aumento na faixa HILIC.

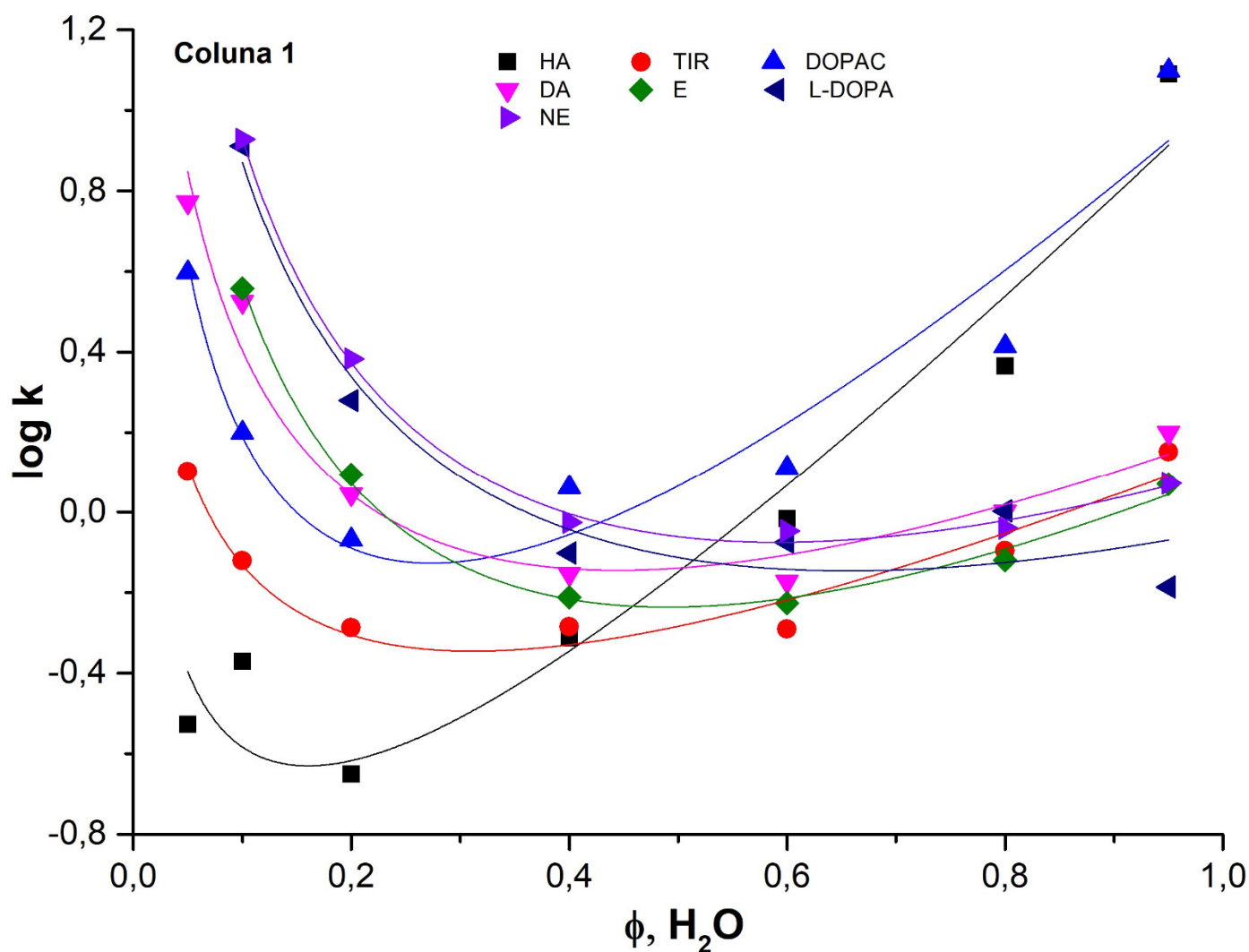


Figura 45: Efeito da concentração de H₂O nas fases móveis aquosas-orgânicas sobre os fatores de retenção, *k*, de neurotransmissores na Coluna 1, coluna poli (MEDSA-co-DiEDMA) não modificada. Faixa de composição: 5-95% acetonitrila

Tabela 7: Parâmetros a_1 , m_{RP} e m_{HILIC} que melhor ajustam os dados experimentais à Equação 3 e os respectivos coeficientes de correlação, R^2 , para neurotransmissores nas colunas monolíticas Coluna 1, Coluna 2, Coluna 3 e Coluna 4 na faixa de composição 5 – 95% de H_2O da fase móvel aquosa-orgânica

	Coluna	a_1	m_{RP}	m_{HILIC}	R^2	φ_{min}
HA	COL 1	$-2,01 \pm 0,51$	$3,05 \pm 0,62$	$1,12 \pm 0,45$	0,910	0,160
	COL 2	$-2,50 \pm 0,60$	$3,58 \pm 0,66$	$2,05 \pm 0,58$	0,922	0,248
	COL 3	$-2,16 \pm 0,50$	$3,07 \pm 0,59$	$1,63 \pm 0,52$	0,928	0,228
	COL 4	$-4,10 \pm 0,81$	$5,25 \pm 0,91$	$3,77 \pm 0,91$	0,934	0,311
TIR	COL 1	$-1,36 \pm 0,16$	$1,50 \pm 0,19$	$1,07 \pm 0,14$	0,905	0,311
	COL 2	$-2,04 \pm 0,31$	$2,02 \pm 0,36$	$1,87 \pm 0,31$	0,844	0,401
	COL 3	$-1,04 \pm 0,17$	$0,87 \pm 0,19$	$0,86 \pm 0,17$	0,805	0,429
	COL 4	$-2,75 \pm 0,33$	$2,94 \pm 0,37$	$2,71 \pm 0,37$	0,924	0,400
DOPAC	COL 1	$-2,12 \pm 0,43$	$3,12 \pm 0,52$	$1,96 \pm 0,38$	0,854	0,272
	COL 2	$-1,93 \pm 0,31$	$2,98 \pm 0,36$	$1,88 \pm 0,31$	0,955	0,274
	COL 3	$-1,98 \pm 0,25$	$2,97 \pm 0,28$	$1,97 \pm 0,25$	0,966	0,288
	COL 4	$-3,05 \pm 0,37$	$4,28 \pm 0,82$	$3,20 \pm 0,41$	0,975	0,324
DA	COL 1	$-1,51 \pm 0,21$	$1,72 \pm 0,28$	$1,76 \pm 0,21$	0,943	0,443
	COL 2	$-1,92 \pm 0,21$	$1,90 \pm 0,27$	$2,09 \pm 0,23$	0,946	0,478
	COL 3	$-1,65 \pm 0,23$	$1,62 \pm 0,27$	$1,87 \pm 0,24$	0,941	0,500
	COL 4	$-2,79 \pm 0,34$	$3,02 \pm 0,38$	$3,32 \pm 0,32$	0,942	0,477
E	COL 1	$-2,92 \pm 0,12$	$2,07 \pm 0,13$	$2,33 \pm 0,11$	0,991	0,489
	COL 2	$-1,81 \pm 0,23$	$1,69 \pm 0,26$	$2,12 \pm 0,23$	0,964	0,544
	COL 3	$-1,55 \pm 0,29$	$1,37 \pm 0,33$	$1,90 \pm 0,29$	0,946	0,600
	COL 4	$-2,62 \pm 0,29$	$2,71 \pm 0,33$	$3,97 \pm 0,57$	0,965	0,519
L - DOPA	COL 1	$-1,54 \pm 0,5$	$1,50 \pm 0,56$	$2,26 \pm 0,50$	0,915	0,655
	COL 2	$-1,81 \pm 0,3$	$1,50 \pm 0,32$	$2,26 \pm 0,28$	0,967	0,655
	COL 3	$-1,37 \pm 0,25$	$1,33 \pm 0,30$	$2,12 \pm 0,26$	0,974	0,695
	COL 4	$-2,94 \pm 0,51$	$2,83 \pm 0,58$	$3,97 \pm 0,57$	0,957	0,609
NE	COL 1	$-1,71 \pm 0,12$	$1,80 \pm 0,11$	$2,44 \pm 0,10$	0,996	0,590
	COL 2	$-1,74 \pm 0,26$	$1,66 \pm 0,30$	$2,39 \pm 0,26$	0,974	0,623
	COL 3	$-1,43 \pm 0,17$	$1,36 \pm 0,20$	$2,14 \pm 0,18$	0,987	0,605
	COL 4	$-2,74 \pm 0,44$	$2,89 \pm 0,56$	$3,78 \pm 0,56$	0,944	0,566

Coeficientes calculados para a Equação 3: $\log k = a_1 + m_{RP} \cdot \varphi_{H_2O} - m_{HILIC} \cdot \log \varphi_{H_2O}$

Ponto mínimo calculado por $\varphi_{min} = 0,434 m_{HILIC} / m_{RP}$

COL 1 = Monolito base não modificado; COL 2 = Monolito modificado pela metade com MPC por luz UV por 10 minutos; COL 3 = Monolito modificado inteiro com MPC por luz UV por 10 minutos; COL 4 = Monolito modificado pela metade com MPC por luz UV por 30 minutos

Com os parâmetros encontrados para as curvas que descrevem valores de $\log k$ em função da composição da fase móvel ($\log k$ vs ϕ_{H_2O}), as curvas de fator de retenção em função da composição da fase móvel para cada composto são prontamente obtidas com a função antilogarítmica da curva em “forma de U” (k vs ϕ_{H_2O}). Os valores teóricos de k podem ser usados para calcular a resolução em função da concentração de H_2O entre todos os picos dos analitos contidos na mistura pela equação:

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2 - k_1}{k_1} \right) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right) \quad (4)$$

em que N é o número de pratos que foi obtido com o pico do tolueno em 95% acetoneitrila, calculado em 3000 pratos ($N = 5,454(t_r/w_h)^2$, t_r = tempo de retenção e w_h é largura de pico à meia altura). As curvas de resolução (Figura 46) apresentam um aumento perto da região composta de H_2O na fase móvel menor do que 20%, o que significa que nessa região a quantidade de acetoneitrila é alta o suficiente para que compostos polares sejam adsorvidos sobre a fase estacionária polar no modo HILIC e a resolução entre os picos aumenta, enquanto que no modo RP também há um aumento na resolução de alguns picos devido à retenção quando a concentração de água é alta para promover interações solvofóbicas, mas é um aumento muito menor pela elevada polaridade dos analitos, e muitos picos não se resolvem.

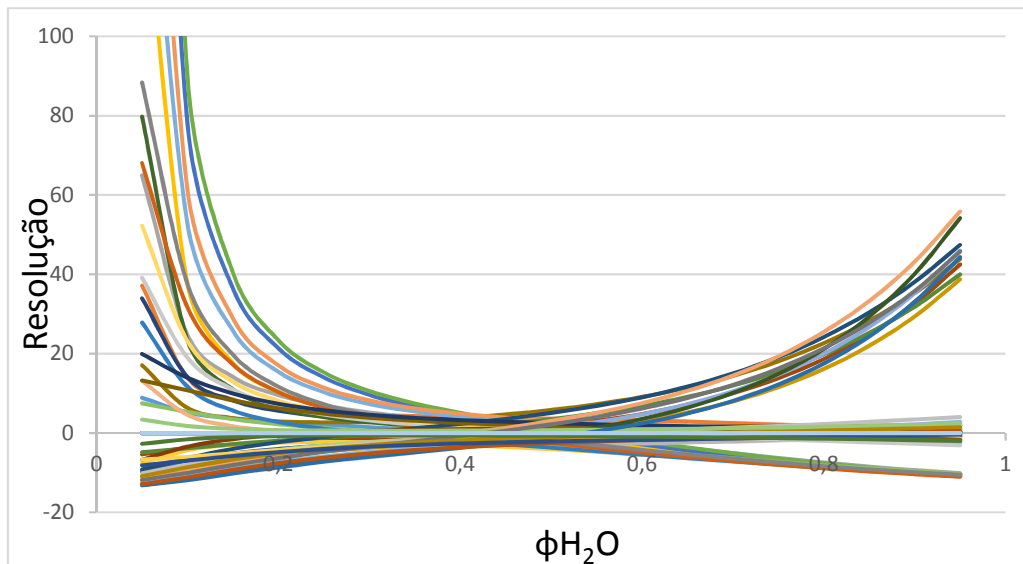


Figura 46: Curvas de resolução teórica entre cada pico da mistura de neurotransmissores calculadas em função da concentração de H₂O na fase móvel, obtidas pela Equação 4 com os fatores de retenção obtidos no experimento da Figura 45

Para avaliar quais são os analitos que apresentariam maior dificuldade de separação, o gráfico é aproximado para a região de resolução igual a 1, a resolução em que a sobreposição entre os picos é pequena (aproximadamente 4% [123]) e os analitos podem ser determinados (Figura 47).

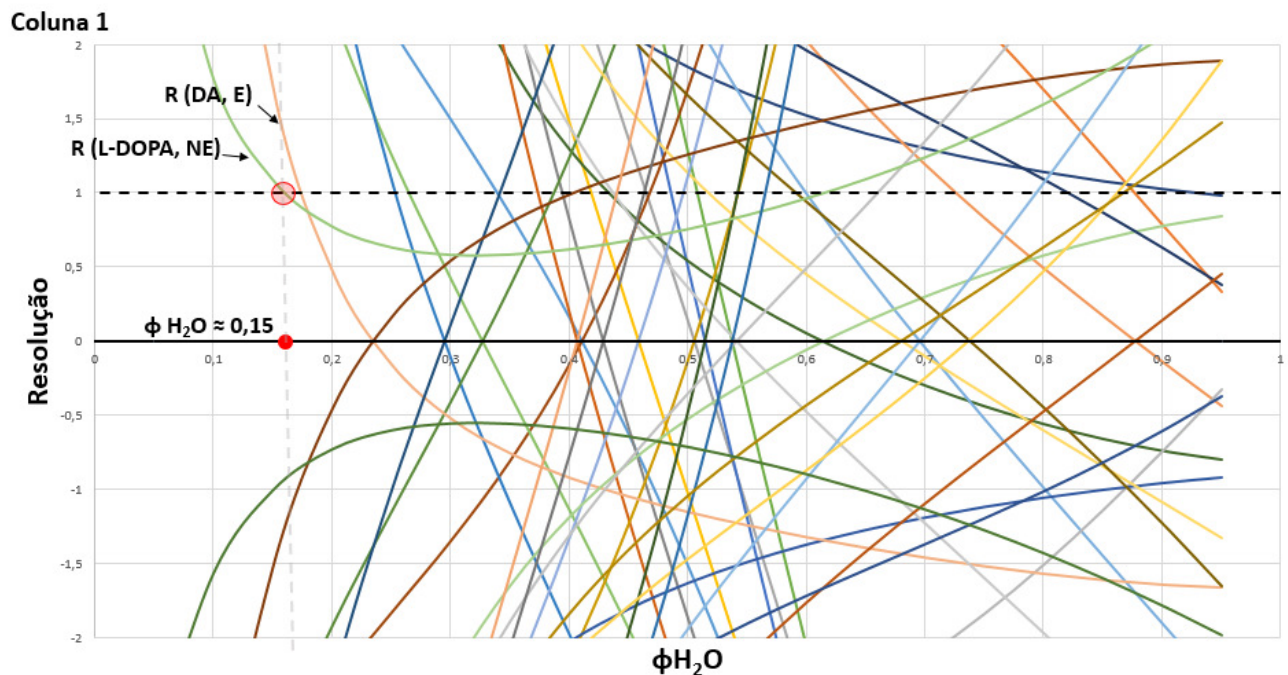


Figura 47: Curvas de resolução teórica entre cada pico para o monolito base (Coluna 1), com “zoom” na região de resolução igual a 1, em que a linha preta pontilhada mostra a resolução com esse valor, acima da qual dois picos da mistura estão resolvidos e abaixo não podem ser determinados devido à sobreposição

Acompanhando a linha pontilhada que mostra a resolução de valor 1, é possível notar que em concentrações de H₂O maiores do que 15% nas fases móveis aquosas-orgânicas várias sobreposições de picos ocorrem. Então separações com fases móveis com concentrações de H₂O maiores do que 15% não permitiriam a leitura confiável dos picos referentes aos analitos desse sistema. No entanto, o ponto vermelho destacado na Figura 47 mostra a composição de fase móvel aquosa-orgânica a partir da qual, com aumento da concentração de acetonitrila, a curva de resolução entre a L-DOPA e norepinefrina (R (L-DOPA, NE) a curva verde apontada no gráfico), que teoricamente não seria resolvida com concentrações mais à direita do gráfico, deixa de ter valor menor do que 1, portanto teoricamente em concentrações de acetonitrila iguais ou maiores que 85% nas fases móveis aquosas-orgânicas todos os picos desse grupo de analitos estariam resolvidos com resolução pelo menos 1. Essa abordagem foi útil para diminuir o esforço em determinar a fase móvel que promoveria a separação, além de mostrar que no modo RP a separação não poderia ser feita para esses analitos. Algumas misturas de analitos polares podem ser separados tanto no modo RP como no modo HILIC com seletividades diferentes, o que foi o caso no exemplo mostrado no item 3.1.3, mas não estava claro se para esse sistema, composto de um grande número de analitos de polaridade diferentes, seria possível a separação de todos os analitos, tanto no modo HILIC como no modo RP, até que as curvas de resolução mostraram que no modo RP há muita sobreposição de picos. Então, além de evitar o preparo fases móveis com altas concentrações de água para tentar alcançar a separação, essa abordagem mostrou que em concentrações próximas da região de 85% de acetonitrila a separação poderia ser feita no modo HILIC. De fato, essa medida é uma aproximação, por ser propensa aos erros do modelo sob altas concentrações de acetonitrila, e a separação foi atingida também em concentração de 80% acetonitrila, como mostrado na Figura 48.

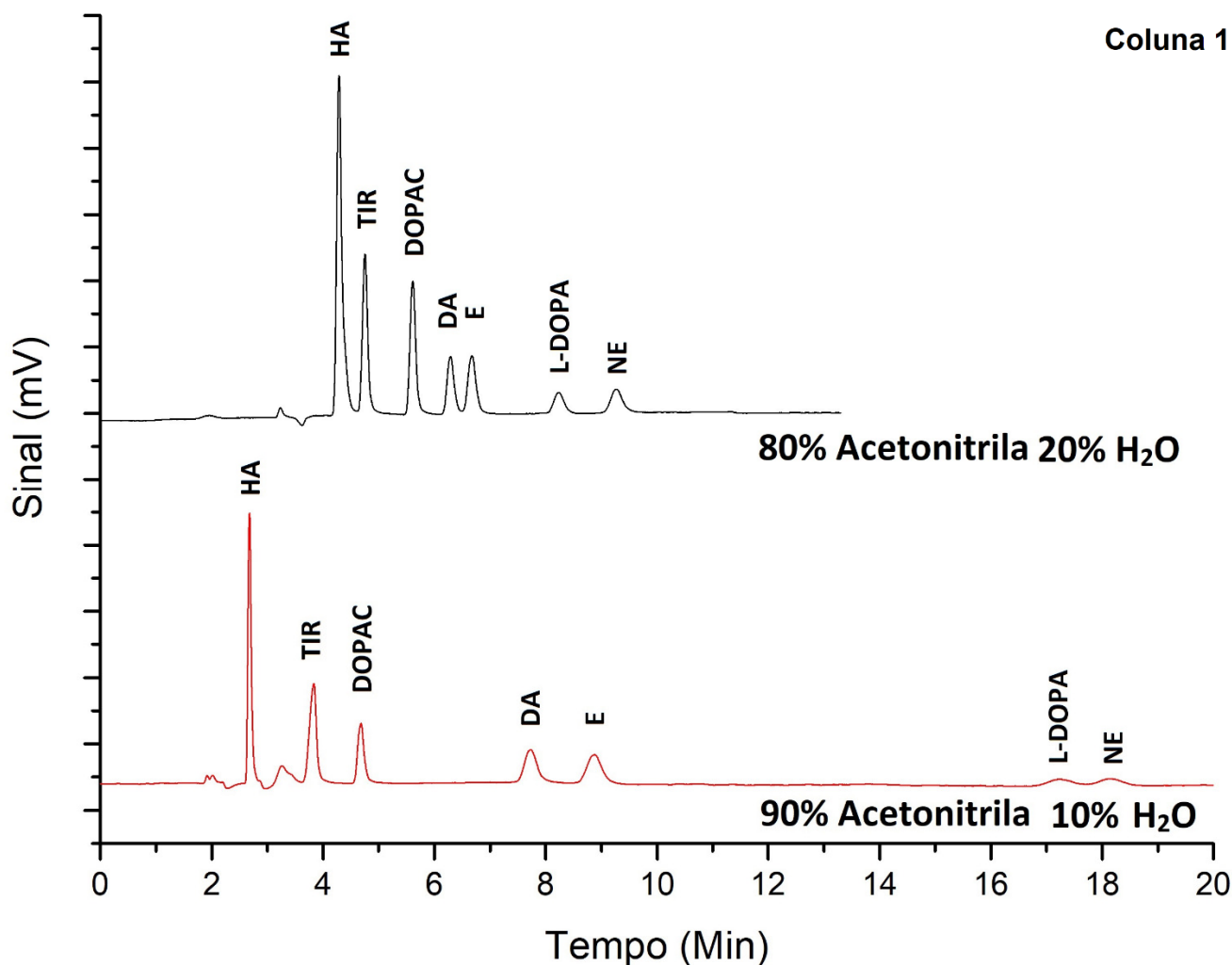


Figura 48: Separações de neurotransmissores na coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) não modificada (Coluna 1). $l = 182$ mm, $id = 100$ μ m, a) 80% ACN, 20 % H₂O, vazão = $0,33$ μ L min^{-1} , pressão = 88 bar b) 90% ACN, 10 % H₂O, vazão = $0,67$ μ L min^{-1} , pressão = 83 bar; todas fases móveis preparadas com adição de 0,1% TFA; Detecção UV a 214 nm

A coluna modificada pela metade do comprimento durante 10 minutos (Coluna 2) também teve as curvas determinadas para cada composto, que são mostradas na Figura 49, e determinados os coeficientes a_1 , m_{RP} e m_{HILIC} da Equação 3. De maneira geral as curvas e coeficientes obtidos não diferem muito do monolito base (Tabela 7).

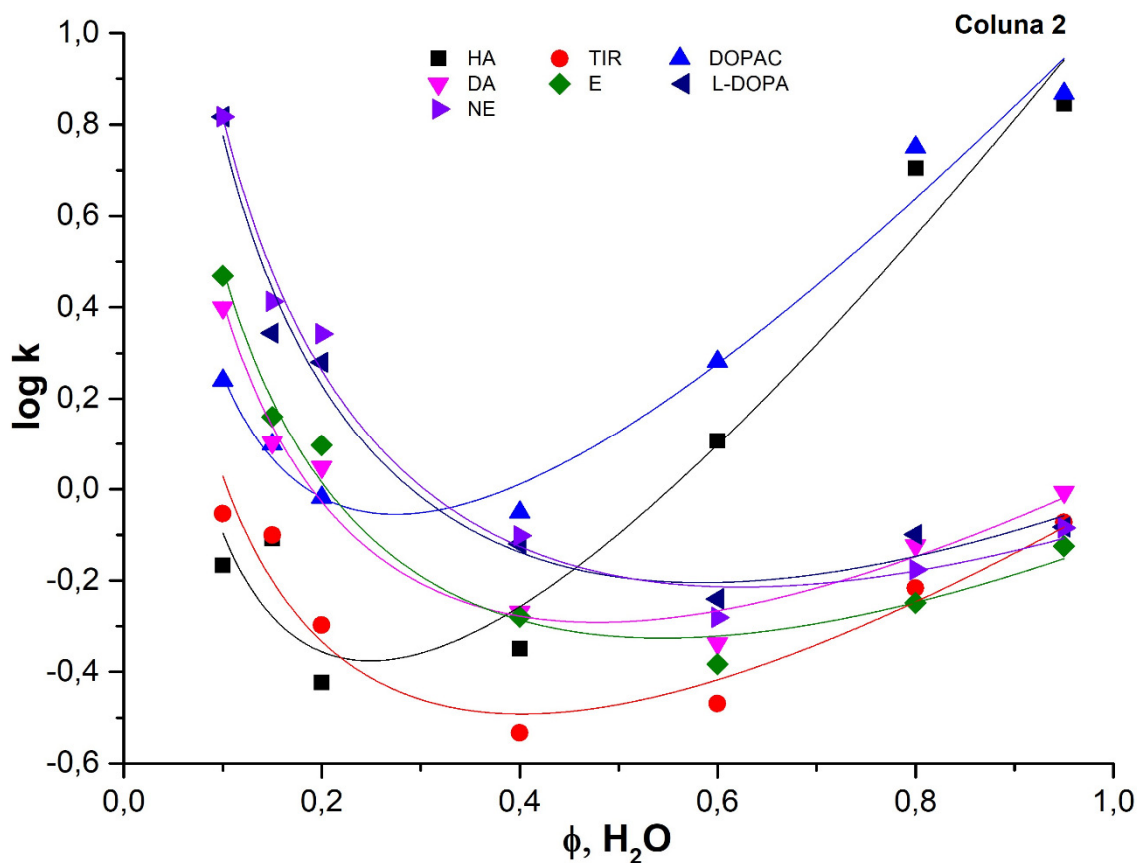


Figura 49: Efeito da concentração de H₂O nas fases móveis aquosas-orgânicas sobre os fatores de retenção, *k*, de neurotransmissores na Coluna 2, poli (MEDSA-co-DiEDMA) modificada pela metade com 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) durante 10 minutos. Faixa de composição: 5-90% acetonitrila

As curvas de resolução da Coluna 2 (Figura 50) não apresentaram mudanças em relação às curvas obtidas com a Coluna 1, prevendo teoricamente a composição que promove a separação de todos os picos com resolução de valor pelo menos 1 em torno de 85% de acetonitrila, idem à coluna não modificada. Na Figura 50 os dois últimos picos a serem resolvidos ao usar fase móvel com crescente concentração de acetonitrila são os da L-DOPA e norepinefrina, os mesmos que na coluna não modificada. Experimentalmente, foi observado que com 85% de acetonitrila ocorre uma sobreposição parcial entre dopamina e epinefrina (Figura 51), picos que apresentam curva de resolução próxima à região de resolução igual a 1.

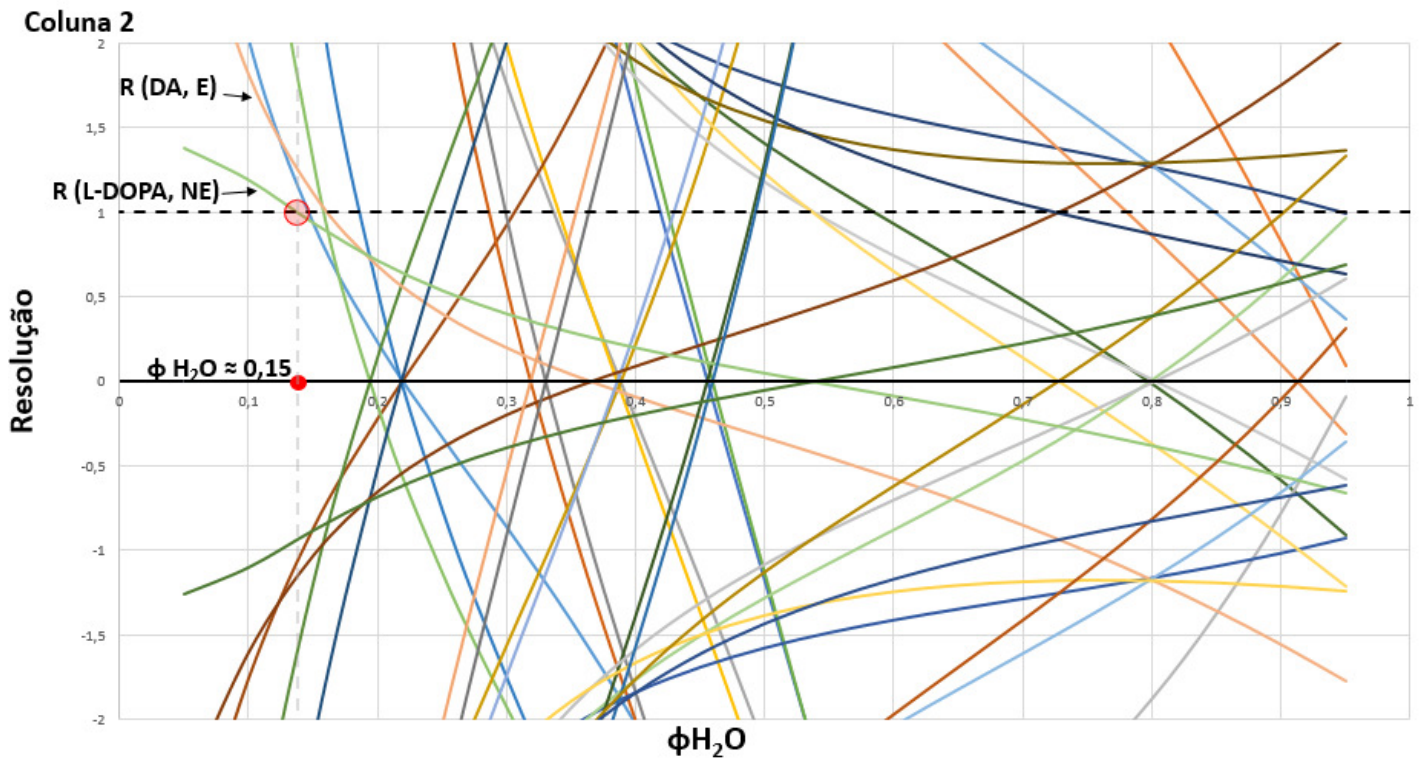


Figura 50: Curvas de resolução obtida para a Coluna 2, com aumento na região de resolução igual a 1, construído com os valores de fator de retenção teóricos obtidos com as curvas da Figura 49. Destaque para a resolução entre L-DOPA e norepinefrina (verde), e dopamina e epinefrina (laranja)

Por isso a composição da fase móvel em que foi alcançada a separação total dos analitos na Coluna 2 foi de 90% acetonitrila e 10% H₂O, que pode ser encontrada na Figura 51.

Para observar com dados experimentais os fatores de retenção previstos pelo mecanismo RP-HILIC, separações foram feitas na Coluna 2 por toda a faixa de composição, mesmo nas composições do modo RP em que se sabia que não seria possível atingir a separação, obtendo cromatogramas com diferentes fases móveis que são apresentados na Figura 51.

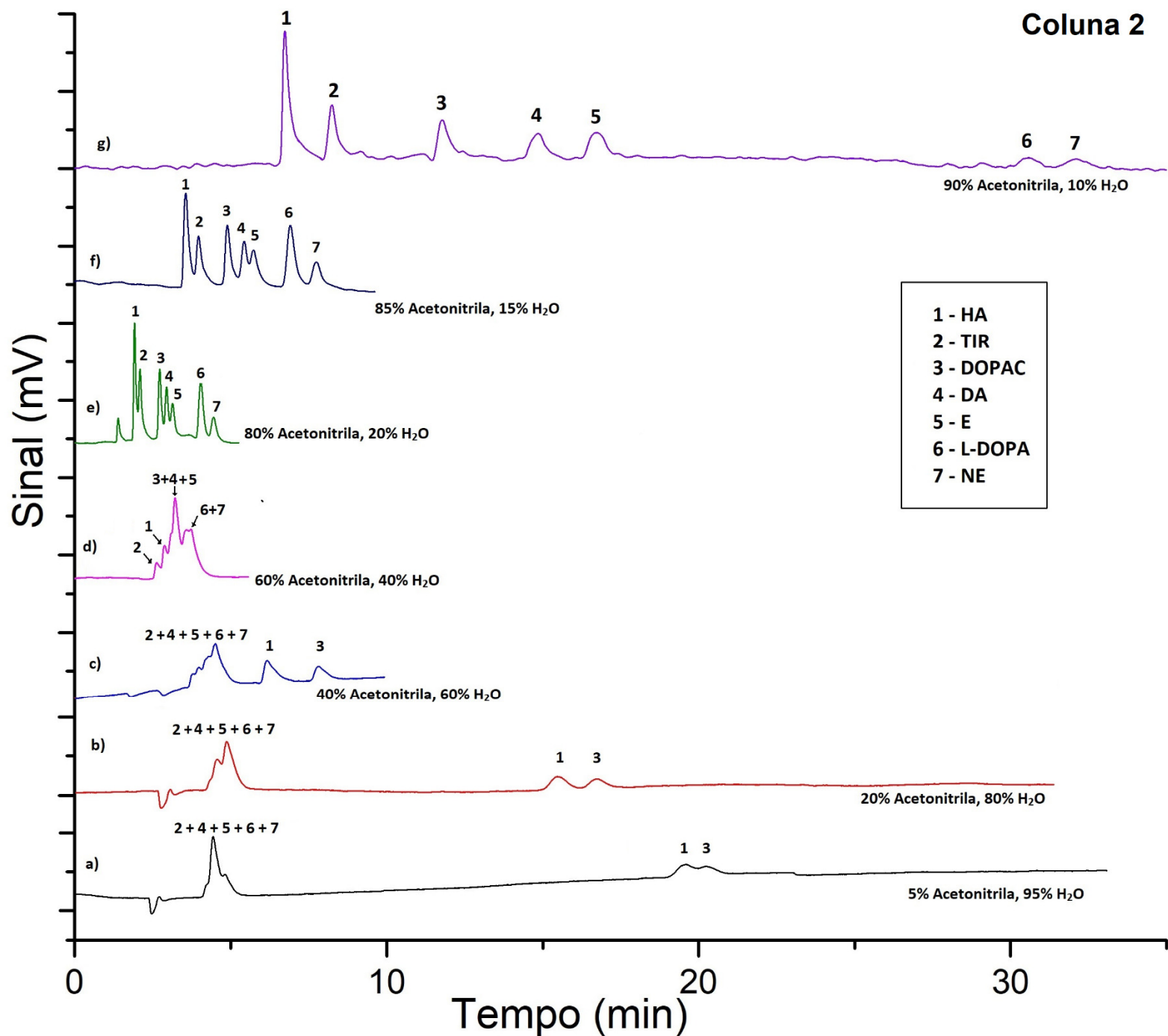


Figura 51: Separações de neurotransmissores na coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) modificada pela metade com 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) durante 10 minutos, Coluna 2. $l = 160$ mm, $id = 100$ μ m, a) 5% ACN, 95 % H₂O, vazão = 0,32 μ L min⁻¹, pressão = 162 bar b) 20% ACN, 80% H₂O, vazão = 0,33 μ L min⁻¹, pressão = 162 bar; c) 40% ACN, 60% H₂O, vazão = 0,35 μ L min⁻¹, pressão = 162 bar; d) 60% ACN, 40 % H₂O, vazão = 0,40 μ L min⁻¹, pressão = 173 bar; e) 80% ACN, 20 % H₂O, vazão = 0,36 μ L min⁻¹, pressão = 162 bar; f) 85% ACN, 15 % H₂O, vazão = 0,32 μ L min⁻¹, pressão = 65 bar; g) 90% ACN, 10 % H₂O, vazão = 0,557 μ L min⁻¹, pressão = 70 bar; todas as fases móveis preparadas com adição de 0,1% TFA; Detecção UV a 214 nm

Na Figura 51 é possível visualizar a diminuição da retenção do ácido homovanílico e do DOPAC conforme são usadas fases móveis aquosas-orgânicas com maiores concentrações de acetonitrila (segundo a ordem a, b, c, d, e, f, g) até chegarem em um ponto mínimo próximo de 80% acetonitrila, a partir do qual a retenção das duas moléculas é governada pelo mecanismo HILIC e há um aumento na retenção (de 80% para 90% ACN). A tiramina permanece pouco retida até 80% acetonitrila, quando tem um pequeno aumento na retenção pelo mecanismo HILIC. Para os demais analitos, dopamina, epinefrina, L-DOPA e norepinefrina a retenção é baixa e eles coeluem até a fase móvel com aproximadamente 60% acetonitrila, a partir da qual são retidos pelo modo HILIC e são separados com alta resolução como observado no cromatograma obtido com 90% acetonitrila. Esses cromatogramas são complementares nesse trabalho, e mostraram experimentalmente o mesmo efeito descrito pela Equação 3, da dependência dos tempos de retenção em função da composição da fase móvel aquosa-orgânica, com tempos de retenção atingindo um valor mínimo na transição entre o mecanismo RP para HILIC.

A coluna modificada por completo durante 30 minutos (Coluna 3) passou pela mesma caracterização. A Figura 52 apresenta o gráfico de $\log k$ vs ϕ H₂O e a Figura 53 as curvas de resolução teóricas. As curvas do gráfico $\log k$ vs ϕ H₂O têm o mesmo aspecto do que as colunas anteriores, e de maneira geral os coeficientes não diferem muito da Coluna 1 e da Coluna 2. As curvas de resolução em sua maioria são similares, com o pico de resolução entre a L-DOPA e norepinefrina próximo a 1 quando a composição de fase móvel é próxima a 85 % acetonitrila, entretanto é notada uma diferença na resolução entre o pico do ácido homovanílico e tiramina (os dois primeiros picos eluídos no modo HILIC). A curva R (HA, TIR) está apontada na Figura 53 em azul e mostra que se fosse usada a fase móvel próxima de 93% acetonitrila os dois picos

teriam resolução menor que 1. A composição de 85% acetonitrila foi usada para separação (Figura 54) e foi notada uma pequena sobreposição entre os dois picos.

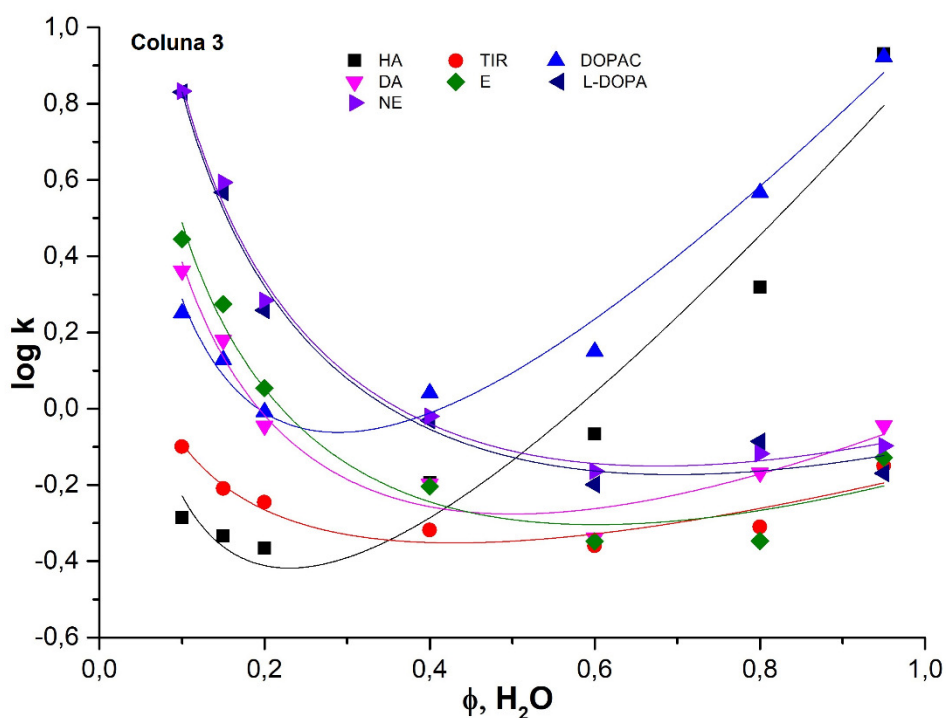


Figura 52: Efeito da concentração de H_2O nas fases móveis aquosas-orgânicas sobre os fatores de retenção, k , de neurotransmissores na Coluna 3, poli (MEDSA-co-DiEDMA) modificada por todo comprimento com 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) durante 30 minutos. Faixa de composição: 5-90% acetonitrila

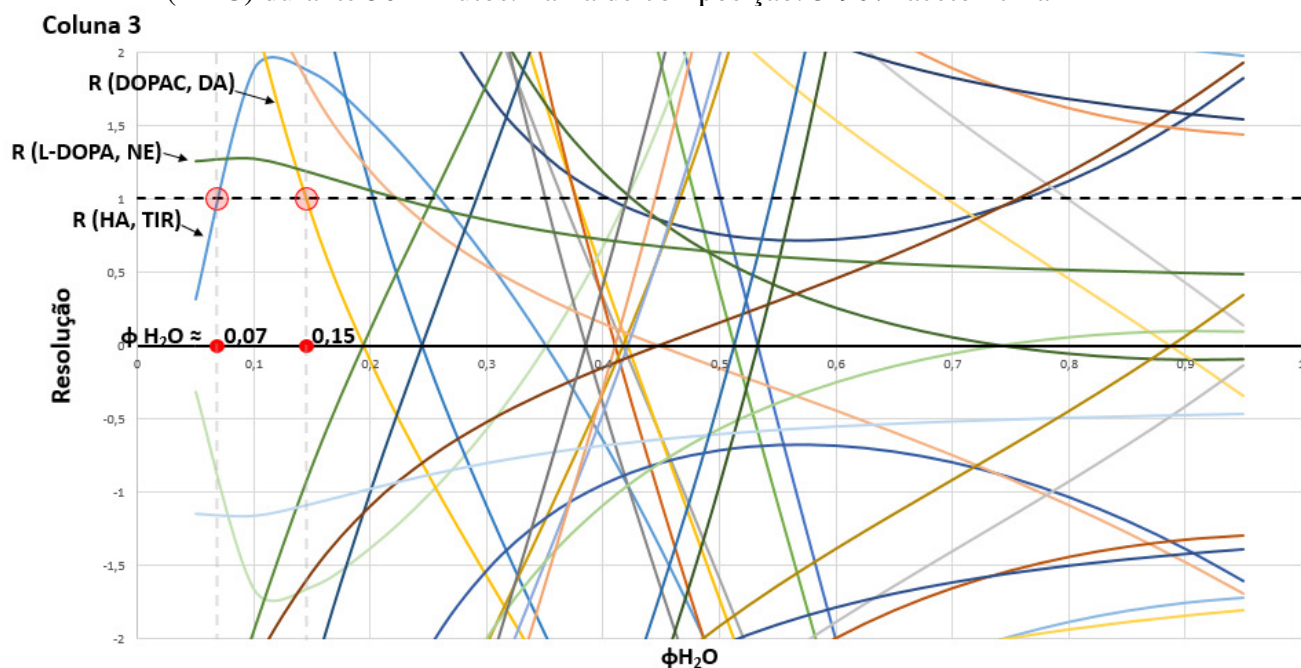


Figura 53: Curvas de resolução obtida para a Coluna 3, com aumento na região de resolução igual a 1, construído com os valores de fator de retenção teóricos obtidos com as curvas da Figura 52. Destaque para a resolução entre HA e TIR (azul), DOPAC e DA (laranja) e L-DOPA e norepinefrina (verde)

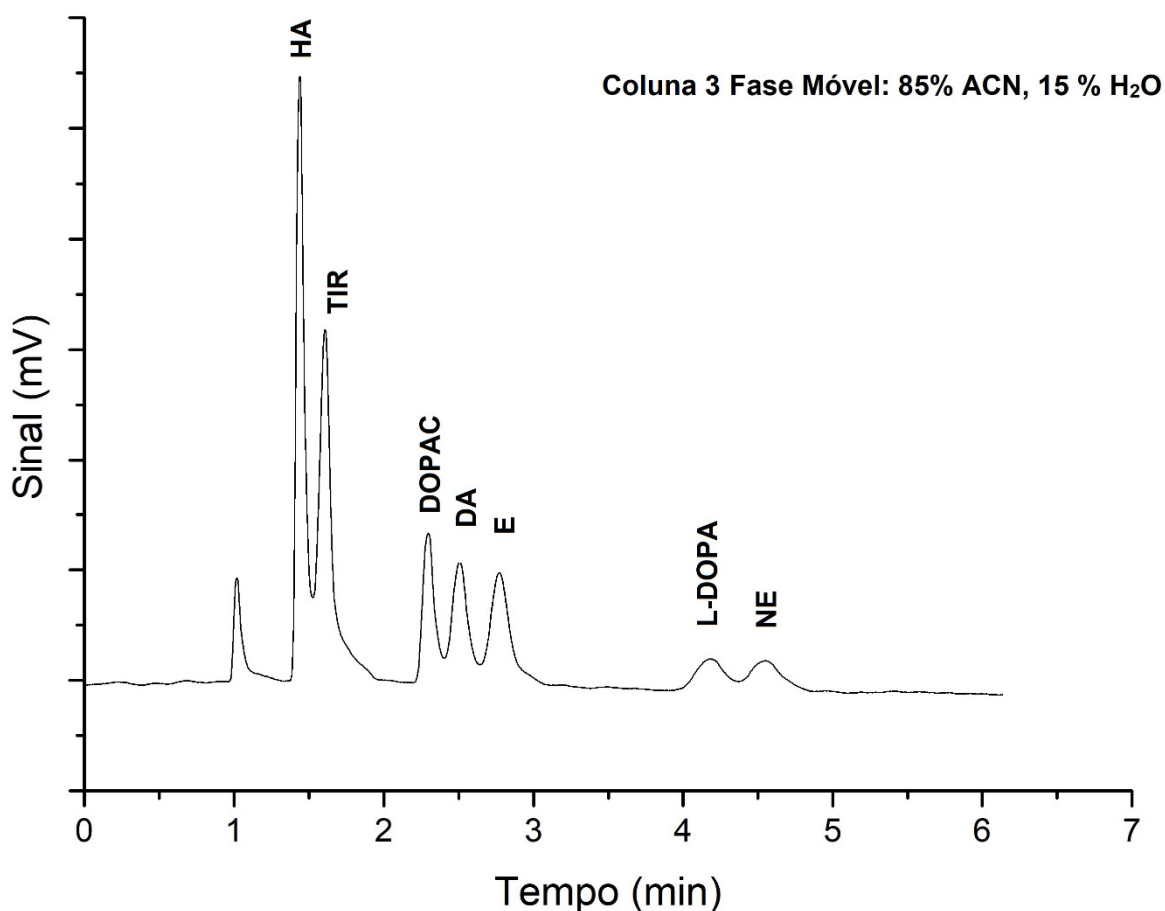


Figura 54: Separação de neurotransmissores na coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) modificada com MPC por todo o comprimento durante 30 minutos (Coluna 3). $l = 172$ mm, $id = 100$ μ m, Fase móvel 85% ACN, 15 % H₂O + 0,1% TFA, vazão = 1,12 μ L min⁻¹, pressão = 148 bar; Detecção UV a 214 nm

A coluna modificada por UV grafting na metade do comprimento por 30 minutos (Coluna 4) apresentou maior variação dos coeficientes (Tabela 7) em relação às outras colunas, o que reflete no aspecto diferenciado das curvas de resolução. Em comparação com as outras curvas, a resolução entre L-DOPA e norepinefrina na Figura 56 tem uma curvatura mais fechada (R (L-DOPA, NE), apontada em vermelho), e limita a resolução a valor menor do que 1 em torno de 19% de H₂O. A resolução entre ácido homovanílico também é mais fechada (R (HA, TIR), apontada em azul), limitando a resolução em concentração 10% de H₂O, enquanto na Coluna 3 essa limitação ocorre somente em 7%.

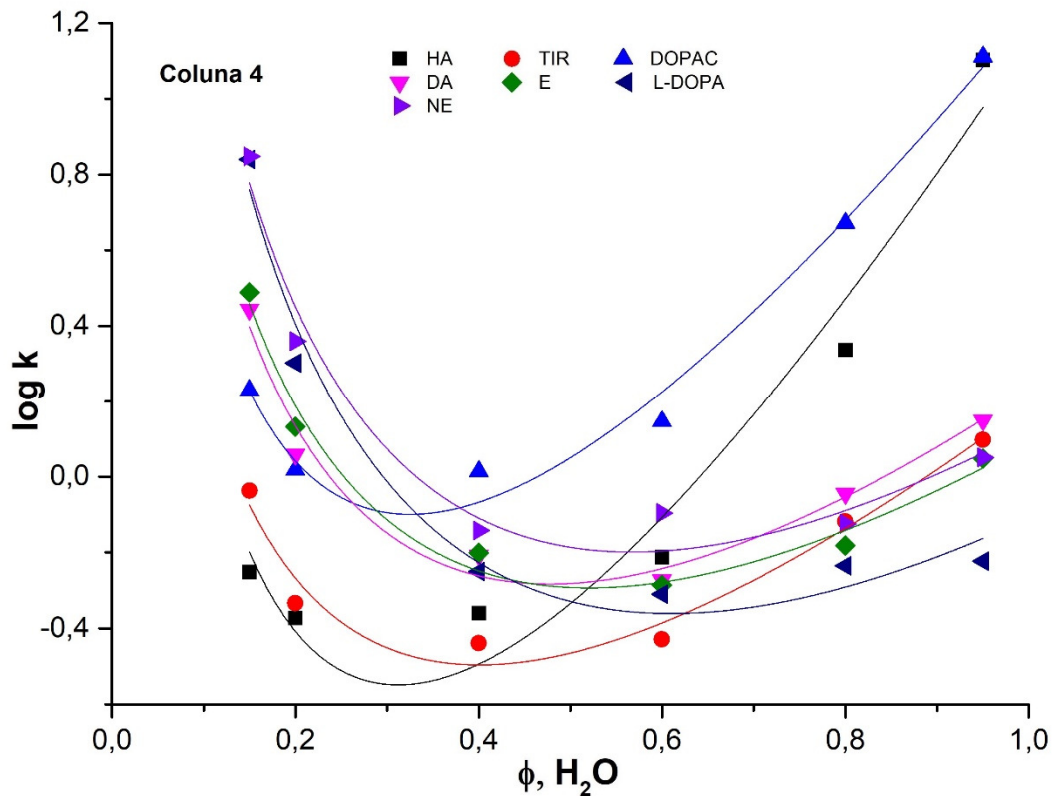


Figura 55: Efeito da concentração de H₂O nas fases móveis aquosas-orgânicas sobre os fatores de retenção, k , de neurotransmissores na Coluna 4, poli (MEDSA-co-DiEDMA) modificada pela metade do comprimento com 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) durante 30 minutos. Faixa de composição: 5-85% acetonitrila

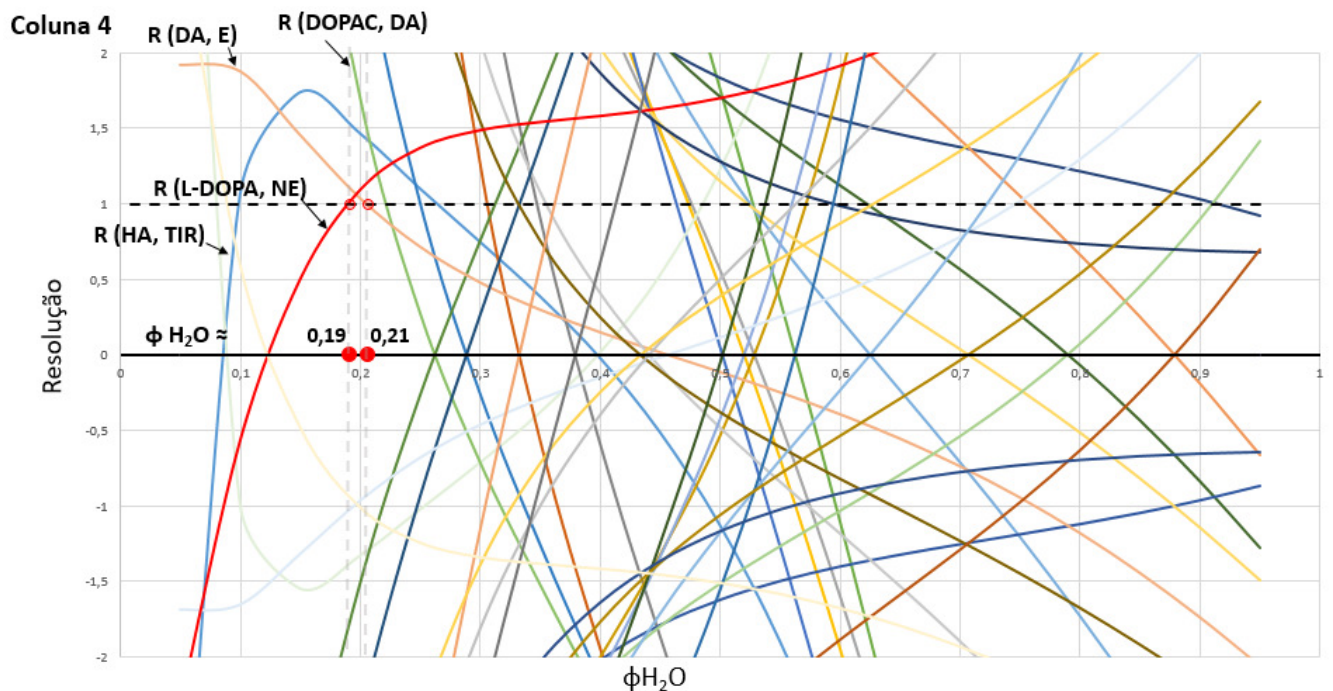


Figura 56: Curvas de resolução obtida para o monólito Coluna 3, com aumento na região de resolução igual a 1, construído com os valores de fator de retenção teóricos obtidos com as curvas da Figura 55. Destaque para resolução entre HA e TIR (azul), DOPAC e DA (verde claro) e L-DOPA e norepinefrina (vermelho) e DA e E (laranja)

Teoricamente, existe um intervalo em que a resolução é maior do que 1 na Coluna 4, que fica entre 21 e 19 % de H₂O, delimitado pela resolução entre os picos da dopamina e epinefrina (R (DA, E), curva laranja apontada na Figura 56) e entre L-DOPA e a norepinefrina (curva vermelha). A separação utilizando 20% de H₂O e 80% de acetonitrila está nessa janela, e na prática resultou em separação dos picos, com uma pequena sobreposição do DOPAC com dopamina (R (DOPAC, DA), que também se encontra na região (Figura 56). De acordo com as curvas de resolução R (L-DOPA, NE) e R (HA, TIR), teoricamente esses picos não estariam resolvidos usando em torno de 10% de H₂O. Isso foi observado na prática ao usar fase móvel de 10% H₂O e 90% acetonitrila na separação (Figura 58), em que a seletividade apresentou mudança significativa em comparação com 20% H₂O e 80% acetonitrila (Figura 57).

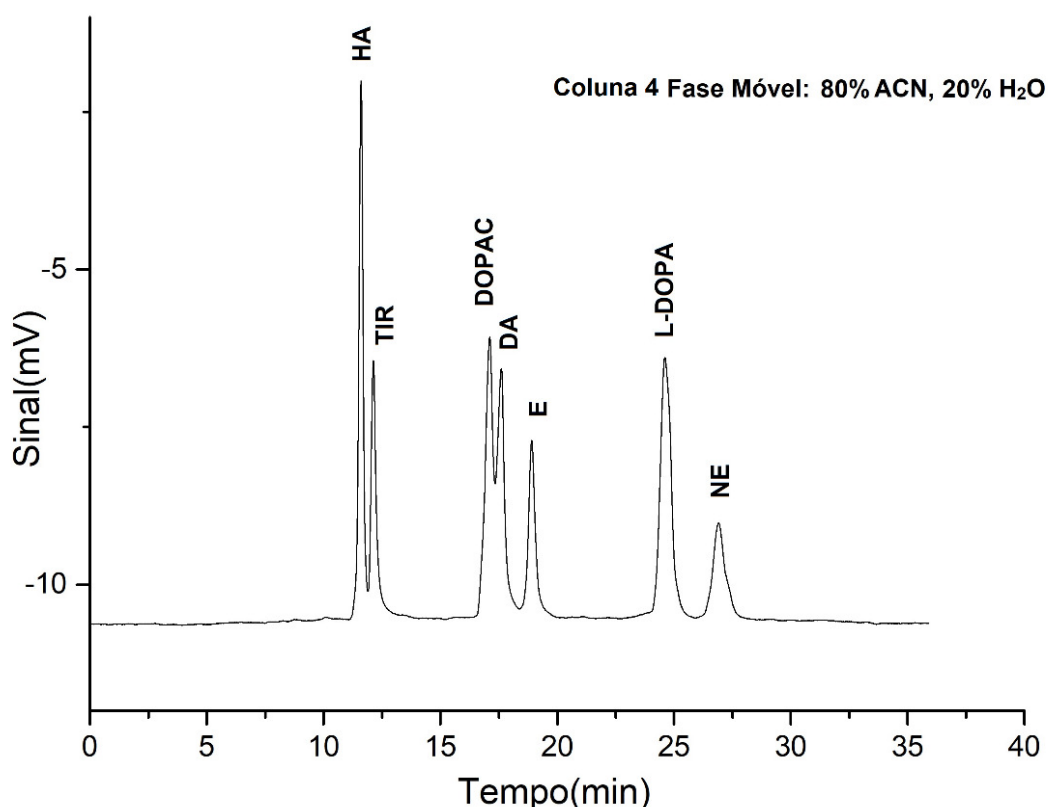


Figura 57: Separação de neurotransmissores na coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) modificada com MPC pela metade do comprimento durante 30 minutos (Coluna 4). $l = 182$ mm, $id = 100$ μ m, Fase móvel 80% ACN, 20 % H₂O + 0,1% TFA, vazão = 0,06 μ L min^{-1} , pressão = 20 bar; Detecção UV a 214 nm

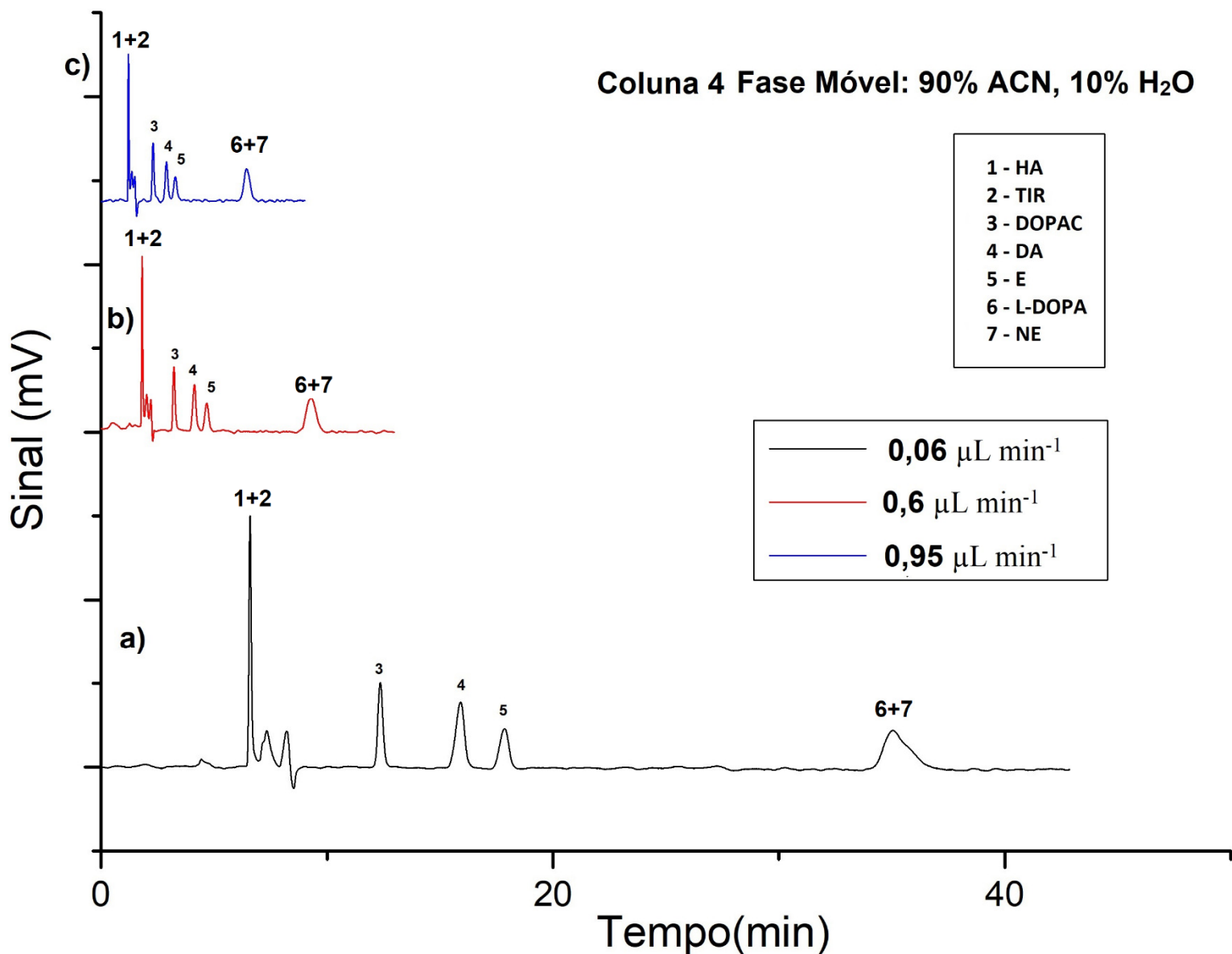


Figura 58: Separação de neurotransmissores na coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) modificada com MPC pela metade do comprimento durante 30 minutos (Coluna 4). $l = 182 \text{ mm}$, $id = 100 \mu\text{m}$, Fase móvel 90% ACN, 10 % H₂O, a) vazão = $0,06 \mu\text{L min}^{-1}$, pressão = 16 bar, b) vazão = $0,6 \mu\text{L min}^{-1}$ pressão = 83 bar, c) vazão = $0,95 \mu\text{L min}^{-1}$ pressão = 104 bar; Fases móveis preparadas com adição de 0,1% TFA Detecção UV a 214 nm

A coeluição dos picos do ácido homovanílico e tiramina e da L-DOPA e norepinefrina na fase móvel de 90% acetonitrila e 10% H₂O mostra uma mudança na seletividade dessa coluna em comparação com as colunas anteriores, em que esse perfil de eluição dos analitos não foi observado em nenhuma fase móvel plausível para atingir a separação no modo HILIC. As duas sobreposições foram apontadas teoricamente e foram observadas

experimentalmente ao usar a fase móvel de 90% acetonitrila e 10% H₂O. Mesmo em diferentes vazões as sobreposições ocorreram, mostrando que não foi um efeito de alargamento de picos resultante da vazão. Por mais que com esse grupo de analitos a modificação afetou negativamente a separação (que já foi obtida entre todos os analitos com o monolito não modificado), no caso da mistura conter outros neurotransmissores, a separação no modo HILIC feita com o monolito base poderia não ser atingida com facilidade, deixando a modificação por UV grafting de grupos polares como uma alternativa para resolver picos que não eram resolvidos anteriormente. Em outras palavras o monolito base pode não ter polaridade superficial suficiente para reter diferencialmente no modo HILIC neurotransmissores de polaridade muito parecida, e foi demonstrado que o aumento da densidade de sítios polares (ao fazer o UV grafting de monômeros zwitteriônicos) causa mudança de seletividade, o que pode aumentar a capacidade de separação dos monolitos.

Ao modificar a coluna na metade as duas regiões contêm grupos zwitteriônicos e retêm os analitos, porém com intensidades diferentes, já que a metade modificada com MPC contém os grupos na superfície, enquanto o monolito base o MEDSA pode estar parcialmente inacessível a interações. A maior diferença de seletividade obtida com a coluna modificada pela metade durante 30 minutos (Coluna 4) do que com a coluna modificada por inteiro (Coluna 3) é decorrência de diferentes retenções em regiões delimitadas do comprimento da coluna conforme os analitos passam da região que exibe maior polaridade (modificada) para a região que exibe menor polaridade (não modificada), em vez de manterem a mesma retenção por toda a coluna, o que mostrou ser de maior influência na seletividade do que na coluna modificada por inteiro. Como a Coluna 2 foi modificada na metade por 10 minutos e não apresentou a mesma mudança de retenção do que a Coluna 4 pode-se afirmar que o tempo de 10 minutos não foi suficiente para promover o enxerto de monômero MPC suficiente na superfície do monolito poli(MEDSA-co-DiEDMA).

3.5. CONCLUSÃO

A separação dos neurotransmissores foi atingida em todas as colunas polares zwitteriônicas poli(MEDSA-co-DiEDMA) em pelo menos uma fase móvel no modo HILIC.

A seletividade foi fortemente dependente da composição da fase móvel acetoniátrica:aqúosa e da polaridade do analito, fornecendo um gráfico em “forma de U” que apresenta um mínimo onde ocorre a transferência de mecanismo RP para HILIC ou vice-versa. Os dados experimentais de fatores de retenção em função da composição da fase móvel foram satisfatoriamente ajustados por regressão não linear com o modelo que descreve o mecanismo duplo RP-HILIC e a partir do modelo foram calculadas curvas de resolução que foram úteís para prever com boa aproximação a seletividade em diferentes composições de fases móveis binárias.

Foi observada uma mudança de seletividade após modificação por grafting de metade do comprimento da coluna durante 30 minutos de exposição de luz UV do monólito na presença do monômero zwitteriônico MPC. No futuro pode ser demonstrada a modificação em maiores variações de tempo e diferentes regiões da coluna, por exemplo um terço ou dois terços do comprimento, para estudar mais a fundo o efeito da modificação de comprimentos delimitados da coluna.

No futuro a coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) pode ser aplicada para a separação de neurotransmissores em amostras biológicas.

4. CONCLUSÃO GERAL

Nessa tese foi demonstrada a versatilidade e a flexibilidade no preparo de monolitos porosos poliméricos para aplicações em Extração em Fase Sólida e Cromatografia líquida, duas de suas mais importantes aplicações realizadas em colunas. Colunas monolíticas baseadas em polimetacrilatos foram modificadas após a polimerização de diferentes maneiras para adquirir propriedades favoráveis para a aplicação. Na primeira parte a coluna poli(GMA-co-EDMA) foi modificada com o complexante ácido iminodiacético (IDA) para aumentar a capacidade de adsorção de metais pelo suporte sólido na Extração em Fase Sólida. Na segunda parte a coluna poli(MEDSA-co-DiEDMA) foi modificada com monômero zwitteriônico 2-metacrilóil-oxietil fosforilcolina (MPC) para aumentar a polaridade da coluna, o que é importante na cromatografia de interação hidrofílica. A alta variedade de composições químicas e modificações possíveis, juntamente com o ajuste das condições de polimerização, tornam monolitos poliméricos um importante tipo de fase estacionária.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Collins, C. H. (2009). Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia. *Scientia Chromatographica*, 1(1), 7–10.
- [2] Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P.S.; Fundamentos de Cromatografia. 7. Ed Campinas: Editora da Unicamp, 1997
- [3] Stulík, K., Pacáková, V., Suchánková, J., & Coufal, P. (2006). Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 841(1–2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.016>
- [4] MacNair, J. E., Patel, K. D., Jorgenson, J. W. (1999); *Anal. Chem.*, 71, 700.
- [5] Faria, A. M., Bottoli, C. B. G., Jardim, I. C. S. F., Collins, C. H. (2006). Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Quim. Nova*, 29(2), 300–309.
- [6] Svec, F. (2017). Monolithic columns: A historical overview. *Electrophoresis*, 38(22–23), 2810–2820. <https://doi.org/10.1002/elps.201700181>
- [7] Svec, F., Fréchet, J. M. J. (1992); *Anal. Chem.*, 64, 820-822
- [8] Urban, J., Jandera, P. (2013). Recent advances in the design of organic polymer monoliths for reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography separations of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(7), 2123–2131. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6392-x>
- [9] Urban, J., Svec, F., Fréchet, J.M. (2010) Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column *Anal. Chem.* 82(5), 1621-1623
- [10] Engelhardt, H., Götzinger, A. (2004). On the reproducibility of Chromolith® RP columns. *Chromatographia*, 60(1), S207–S211. <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0238-4>
- [11] Guiochon, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 1168(1–2), 101–68; discussion 100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.090>
- [12] Sklenářová, H., Chocholouš, P., Koblová, P., Zahálka, L., Šatínský, D., Matysová, L., Solich, P. (2013). High-resolution monolithic columns - A new tool for effective and quick separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(7), 2255–2263. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6561-y>

- [13] Cabrera, K. (2004). Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, 27(10–11), 843–852. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401827>
- [14] Eeltink, S., Wouters, S., Dores-Sousa, J.L., Svec, F. (2017) Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides and peptides. *Journal of Chromatography A*, 1498(8-21)
- [15] Nischang, I., Brueggemann, O., & Svec, F. (2010). Advances in the preparation of porous polymer monoliths in capillaries and microfluidic chips with focus on morphological aspects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 953–960. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3550-x>
- [16] Nischang, I., Brueggemann, O., & Svec, F. (2010). Advances in the preparation of porous polymer monoliths in capillaries and microfluidic chips with focus on morphological aspects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 953–960. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3550-x>
- [17] Jandera, P. (2013). Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review. *Journal of Chromatography A*, 1313, 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.010>
- [18] Svec, F. (2010). Porous polymer monoliths: amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *Journal of Chromatography. A*, 1217(6), 902–924. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.073>
- [19] Urban, J., Jandera, P., & Langmaier, P. (2011). Effects of functional monomers on retention behavior of small and large molecules in monolithic capillary columns at isocratic and gradient conditions. *Journal of Separation Science*, 34(16–17), 2054–2062. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100174>
- [20] Courtois, J., Byström, E., & Irgum, K. (2006). Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation. *Polymer*, 47(8), 2603–2611. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.01.096>
- [21] Yu, S., Ng, F. L., Ma, K. C. C., Mon, A. A., Ng, F. L., & Ng, Y. Y. (2013). Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(4), 2641–2647. <https://doi.org/10.1002/app.37514>
- [22] Waguespack, B. L., Hodges, S. A., Bush, M. E., Sondergeld, L. J., & Bushey, M. M. (2005). Capillary electrochromatography column behavior of butyl and lauryl acrylate porous polymer monoliths. *Journal of Chromatography A*, 1078(1–2), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.083>
- [23] Svec, F., & Fréchet, J. M. J. (1995). Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of “Molded” Porous Materials with High Flow Characteristics for

Separations or Catalysis. *Chemistry of Materials*, 7(4), 707–715.
<https://doi.org/10.1021/cm00052a016>

- [24] Trojer, L., Bisjak, C. P., Wieder, W., & Bonn, G. K. (2009). High capacity organic monoliths for the simultaneous application to biopolymer chromatography and the separation of small molecules. *Journal of Chromatography A*, 1216(35), 6303–6309.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.010>
- [25] Stachowiak, T. B., Mair, D. A., Holden, T. G., Lee, L. J., Svec, F., & Fréchet, J. M. J. (2007). Hydrophilic surface modification of cyclic olefin copolymer microfluidic chips using sequential photografting. *Journal of Separation Science*, 30(7), 1088–1093.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200600515>
- [26] Urban, J. (2016). Current trends in the development of porous polymer monoliths for the separation of small molecules. *Journal of Separation Science*, 39(1), 51–68.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201501011>
- [27] Svec, F., & Lv, Y. (2014). Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography. *Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography*. <https://doi.org/10.1021/ac504059c>
- [28] Svec, F. (2006). Less common applications of monoliths: preconcentration and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 841(1–2), 52–64.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.055>
- [29] Jiang, T., Mallik, R., & Hage, D. S. (2005). Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction. *Analytical Chemistry*, 77(8), 2362–2372.
<https://doi.org/10.1021/ac0483668>
- [30] Du, F., Sun, L., Zhen, X., Nie, H., Zheng, Y., & Ruan, G. (2015). High-internal-phase-emulsion polymeric monolith coupled with liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry for enrichment and sensitive detection of trace cytokinins in plant samples, 6071–6079. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8782-3>
- [31] Zheng, H., Zhu, T., Li, X., Ma, J., & Jia, Q. (2017). Peanut agglutinin and β -cyclodextrin functionalized polymer monolith: Microextraction of IgG galactosylation coupled with online MS detection. *Analytica Chimica Acta*, 983, 141–148.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.06.034>
- [32] Toll, H., Wintringer, R., Schweiger-Hufnagel, U., & Huber, C. G. (2005). Comparing monolithic and microparticulate capillary columns for the separation and analysis of peptide mixtures by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28(14), 1666–1674. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500155>
- [33] Stulík, K., Pacáková, V., Suchánková, J., & Coufal, P. (2006). Monolithic organic polymeric columns for capillary liquid chromatography and electrochromatography.

- [34] Pan, J., Zhang, C., Zhang, Z., & Li, G. (2014). Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 815, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.017>
- [35] Baryla, N. E., & Toltl, N. P. (2003). On-line preconcentration in capillary electrophoresis using monolithic methacrylate polymers. *The Analyst*, 128(8), 1009. <https://doi.org/10.1039/b303701k>
- [36] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., & Guzman, N. a. (2007). Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1140(1–2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.092>
- [37] Armenta, J. M., Gu, B., Humble, P. H., Thulin, C. D., & Lee, M. L. (2005). Design and evaluation of a coupled monolithic pre-concentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunoglobulin G from human serum. *Journal of Chromatography. A*, 1097(1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.050>
- [38] Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H., Aass, C., & Wilson, S. R. (2014). On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006>
- [39] Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H., Aass, C., & Wilson, S. R. (2014). On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006>
- [40] Yu, C., Davey, M. H., Svec, F., & Fréchet, J. M. J. (2001). Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 73(21), 5088–5096. <https://doi.org/10.1021/ac0106288>
- [41] Šatínský, D., Solich, P., Chocholouš, P., & Karlíček, R. (2003). Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, 499(1–2), 205–214. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00625-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00625-1)
- [42] Guttman, A., Rejtar, T., Monzo, A. (2009) Optimization of poly (GMA-co-EDMA) Monolithic Support for Trypsin Nanoreactor Fabrication. *Journal of Chromatographic Science*, 47, 467-472
- [43] Masini, J. C., & Svec, F. (2017). Analytica Chimica Acta Porous monoliths for on-line sample preparation : A review. *Analytica Chimica Acta*, 964, 24–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.002>

- [44] O.G. Potter, E.F. Hilder, Porous polymer monoliths for extraction: diverse applications and platforms, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1881e1906, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200800116>
- [45] A. Namera, A. Nakamoto, T. Saito, S. Miyazaki, Monolith as a new sample preparation material: recent devices and applications, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 901e924, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000795>.
- [46] A. Namera, T. Saito, Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 182e196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.017>.
- [47] Schroeder, H.A., Darrow, D.K. (1973) Relation of trace metals to human health effects *Chemical Analysis of the environment and other modern techniques: Progress in Analytical Chemistry* 5, 81-104
- [48] Tchounwou, P.B., Yedjou, C. G., Anita, K., Dwayne, J. (2014) Heavy Metals Toxicity and the Environment *National Institute of Health* 101, 133-164
- [49] Monteiro, A. S. C., Parat, C., Rosa, A. H., & Pinheiro, J. P. (2016). Towards field trace metal speciation using electroanalytical techniques and tangential ultrafiltration. *Talanta*, 152, 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2016.01.053>
- [50] Das, D., Dutta, M., Cervera, M. L., & de la Guardia, M. (2012). Recent advances in on-line solid-phase pre-concentration for inductively-coupled plasma techniques for determination of mineral elements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, 35–45. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.10.008>
- [51] Buszewski, B., & Szultka, M. (2012). Critical Reviews in Analytical Chemistry Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, 8347. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- [52] Rocha, F.R.P., Batista, A. D., Melchert, W. R., & Zagatto, E. A. G. (2018). Solid-phase extractions in flow analysis *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90, 803–824 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170513>.
- [53] Namera, A., & Saito, T. (2013). Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 182–196. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.017>
- [54] Rodrigues, A., Eugênia, M., & Queiroz, C. (2008). Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluídos biológicos *Química Nova* 31(7), 1814–1819.
- [55] Candish, E., Wirth, H.-J., Gooley, A. a., Shellie, R. a., & Hilder, E. F. (2015). Characterization of large surface area polymer monoliths and their utility for rapid,

selective solid phase extraction for improved sample clean up. *Journal of Chromatography A*, 1410, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.065>

- [56] Eeltink, S., Wouters, S., Dores-Sousa, J. L., & Svec, F. (2017). Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides. *Journal of Chromatography A*, 1498, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.002>
- [57] Wang, H., Zhang, H., Lv, Y., Svec, F., & Tan, T. (2014). Polymer monoliths with chelating functionalities for solid phase extraction of metal ions from water. *Journal of Chromatography A*, 1343, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.072>
- [58] Tyrrell, É., Nesterenko, P. N., & Paull, B. (2007). Flow Analysis Method Using Chelating CIM Monolithic Disks for Monitoring Dissolved Labile Copper in Environmental Water Samples Monolithic Disks for Monitoring Dissolved Labile Copper in Environmental, 6076. <https://doi.org/10.1080/10826070600832897>
- [59] Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.004>
- [60] Šatínský, D., Solich, P., Chocholouš, P., & Karliček, R. (2003). Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, 499(1–2), 205–214. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00625-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00625-1)
- [61] Chocholous, P., Vacková, J., Srámková, I., Satínský, D. and Solich, P. (2013). Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. *Talanta*, 103: 221-227.
- [62] [Ruzicka, J., Pollema, C.H., Scudder, K.M.. \(1993\) Jet ring cell: a tool for flow injection spectroscopy and microscopy on a renewable solid support. *Anal Chem.*; 65: 3566-3570.](#)
- [63] Geiser, L., Eeltink, S., Svec, F., Fréchet, J.M.J. (2007) Stability and repeatability of capillary columns based on porous monoliths of poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) *Journal of Chromatography A*, 1140, 140-146
- [64] Skerikova, V., Urban, J. (2013) Highly stable surface modification of hypercrosslinked monolithic capillary columns and their application in hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep Sci*, 36 2806–2812. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300395>
- [65] Miró, M., & Hansen, E. H. (2012). Recent advances and future prospects of mesofluidic Lab-on-a-Valve platforms in analytical sciences - A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 750, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.049>

- [66] Ruzicka, J., February, R., & April, A. (2000). Lab-on-valve : universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *2000*(April), 1053–1060. <https://doi.org/10.1039/b001125h>
- [67] Vidigal, S. S. M. P., Tóth, I.V., Rangel, A. O. S. S. (2013). Sequential injection lab-on-valve platform as a miniaturization tool for solid phase extraction, *Analytical Methods* 5 585–597. <https://doi.org/10.1039/c2ay26322j>
- [68] Serrano, N., Díaz-Cruz, J. M., Ariño, C., & Esteban, M. (2007). Stripping chronopotentiometry in environmental analysis. *Electroanalysis*, 19(19–20), 2039–2049. <https://doi.org/10.1002/elan.200703956>
- [69] Pesavento, M., Alberti, G., & Biesuz, R. (2009). Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta*, 631(2), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.046>
- [70] do Nascimento, F. H., & Masini, J. C. (2016). Sequential Injection Assisted Stripping Chronopotentiometry at Screen Printed Gold Electrodes for Determination of Hg(II) in Adsorption Studies. *Analytical Letters*, 49(5), 699–710. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1038549>
- [71] Wang, J. (1982). Anodic stripping voltammetry as an analytical tool. *Environmental Science & Technology*, 16(2), 104A–9A. <https://doi.org/10.1021/es00096a724>
- [72] Nascimento, V.B., Angnes, L. (1998) Eletrodos fabricados por “silk-screen” *Quimica Nova* 21(5) 614-629
- [73] I. Palchetti, S. Laschi, M. Mascini, Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals, *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 61–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.065>.
- [74] Umemura, T., Ueki, Y., Tsunoda, K. I., Katakai, A., Tamada, M., & Haraguchi, H. (2006). Preparation and characterization of methacrylate-based semi-micro monoliths for high-throughput bioanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 566–571.
- [75] Y. Ueki, T. Umemura, J. Li, T. Odake, K.I. Tsunoda, Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography, *Anal. Chem.* 76 (2005) 7007–7012, <http://dx.doi.org/10.1021/ac040079g>.
- [76] Masini, J. C. (2016). Separation of proteins by cation-exchange sequential injection chromatography using a polymeric monolithic column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(5), 1445–1452. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9242-9>
- [77] F. Svec, Quest for organic polymer-based monolithic columns affording enhanced efficiency in high performance liquid chromatography separations of small molecules in

- isocratic mode, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 250–262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.019>.
- [78] Y. Ueki, T. Umemura, J. Li, T. Odake, K.I. Tsunoda, Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography, *Anal. Chem.* 76 (2005) 7007–7012, <http://dx.doi.org/10.1021/ac040079g>
- [79] Q. Luo, H. Zou, X. Xiao, Z. Guo, L. Kong, X. Mao, Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate), *J. Chromatogr. A.* 926 (2001) 255–264, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01055-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01055-X)
- [80] D. Rahmi, Y. Takasaki, Y. Zhu, H. Kobayashi, S. Konagaya, H. Haraguchi, T. Umemura, Preparation of monolithic chelating adsorbent inside a syringe filter tip for solid phase microextraction of trace elements in natural water prior to their determination by ICP-MS, *Talanta* 81 (2010) 1438–1445, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.048>
- [81] H. Wang, H. Zhang, Y. Lv, F. Svec, T. Tan, Polymer monoliths with chelating functionalities for solid phase extraction of metal ions from water, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 128–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.072>
- [82] R.D. Arrua, M.C. Strumia, C.I.A. Igarzabal, Macroporous monolithic polymers: preparation and applications, *Materials* 2 (2009) 2429–2466, <http://dx.doi.org/10.3390/ma2042429>
- [83] S. Yu, F.L. Ng, K.C.C. Ma, A.A. Mon, F.L. Ng, Y.Y. Ng, Effect of porogenic solvent on the porous properties of polymer monoliths, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 2641–2647, <http://dx.doi.org/10.1002/app.37514>
- [84] K. Bielicka-Daszkiwicz, A. Voelkel, Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents, *Talanta* 80 (2009) 614–621, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.037>
- [85] F. Suo, B. Chen, M. He, B. Hu, Monolithic capillary microextraction on-line combined with ICP-MS for determining Ni, Cu and Cd in biological samples, *Anal. Methods* 8 (2016) 4680–4688, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AY01008C>.
- [86] USEPA – United States Environmental Protection Agency, National primary drinking water regulations, 17. (<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>), 2009.
- [87] CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil) Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012. / Ministério do Meio Ambiente. Brasília: MMA, 2012.

- [88] Rubí, E., Jiménez, M. S., de Mirabó, F. B., Forteza, R., & Cerdà, V. (1997). Preconcentration and atomic absorption determination of iron by sequential injection analysis. *Talanta*, 44(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02059-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02059-0)
- [89] Jiménez, M. S., Velarte, R., & Castillo, J. R. (2002). Performance of different preconcentration columns used in sequential injection analysis and inductively coupled plasma-mass spectrometry for multielemental determination in seawater. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 57(3), 391–402. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00401-3](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00401-3)
- [90] P. Ling, F. Liu, L. Li, X. Jing, B. Yin, K. Chen, A. Li, (2010) Adsorption of divalent heavy metal ions onto IDA-chelating resins: simulation of physicochemical structures and elucidation of interaction mechanisms, *Talanta* 81 424–432, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.019>
- [91] L. Fontana, A.L.S. Albuquerque, M. Brenner, D.M. Bonotto, T.P.P. Sabaris, M.A.F. Pires, M.E.B. Cotrim, D.C. Bicudo, (2014) The eutrophication history of a tropical water supply reservoir in Brazil, *J. Paleolimnol.* 51 29–43, <http://dx.doi.org/10.1007/s10933-013-9753-3>
- [92] L.F. Ribeiro, J.C. Masini, (2014) Automated determination of Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Zn (II) in environmental samples by square wave voltammetry exploiting sequential injection analysis and screen printed electrodes, *Electroanalysis* 26 2754–2763, <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201400462>
- [93] Schultz, K. N., Kennedy, R. T. (2008) Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications. *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 1, 627–661.
- [94] Huang, X., Guo, X., Wang, H., & Zhang, H. (2014). Analysis of catecholamines and related compounds in one whole metabolic pathway with high performance liquid chromatography based on derivatization. *ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.038>
- [95] He, M., Wang, C., & Wei, Y. (2016). Selective enrichment and determination of monoamine neurotransmitters by CU(II) immobilized magnetic solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Talanta*, 147, 437–444. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.10.017>
- [96] Gu, Q., Shi, X., Yin, P., Gao, P., Lu, X., & Xu, G. (2008). Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry, 9, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.017>
- [97] Hiroi, T., Imaoka, S., & Funae, Y. (1998). Dopamine Formation from Tyramine by CYP2D6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(3), 838–843. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.9232>

- [98] Tsunoda, Makoto (2006) Recent Advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 506-514
- [99] Sardella, R., Scorzoni, S., Conte, C., Lisanti, A., Ianni, F., & Natalini, B. (2014). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Novel orthogonal liquid chromatography methods to dose neurotransmitters involved in Parkinson ' s disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.018>
- [100] N., Shakulashvili, Ch. Finkler, H., Engelhardt (1998) Separation of Catecholamines and Serotonin by Micellar Electrokinetic Chromatography with UV Detection *Chromatographia* 47 89-92
- [101] Urban, J, Komendová, M. & Jank, S. (2016). Development of an online solid phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine, *J. Sep. Sci.*, 39, 4107–4115. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600818>
- [102] Kanamori, T., Isokawa, M., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2015). Development of analytical method for catechol compounds in mouse urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 985, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.038>
- [103] Stanková, M., Jandera, P. (2016) Dual retention Mechanism in Two-dimensional LC Separations of Barbiturates, Sulfonamides, Nucleic Bases and Nucleosides on Polymetacrilate Zwitterionic Monolithic Micro-Columns *Chromatographia*, 79, 657-666
- [104] Stanková, M., Jandera, P., Skeriková, V., Urban, J. (2013) Crosslinker effects on separation efficiency on (poly)methacrylate capillary monolithic columns. Part II. Aqueous normal-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1289, 47-57
- [105] Tijunelyte, I., Babinot, J., Guerrouache, M., Valincius, G., & Carbonnier, B. (2012). Hydrophilic monolith with ethylene glycol-based grafts prepared via surface confined thiol-ene click photoaddition. *Polymer*, 53(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.11.014>
- [106] Viklund, C., & Irgum, K. (2000). Synthesis of porous zwitterionic sulfobetaine monoliths and characterization of their interaction with proteins. *Macromolecules*, 33(7), 2539–2544. <https://doi.org/10.1021/ma991965+>
- [107] A.J. Alpert, (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* 499 177–196.
- [108] R.I. Chirita, C. West, A.L. Finaru, C. Elfakir, (2010) Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: application to neurotransmitters analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 3091–3104.

- [109] Jandera, P. (2008). Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *Journal of Separation Science*, 31(9), 1421–1437.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200800051>
- [110] Jin, G., Gou, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Yu., Liang, X. (2008) Study on the retention equation in hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 76 522-527
- [111] Jandera, P., Stanková, M., Hájek, T. (2013) New zwitterionic polymethacrylate monolithic columns for one- and two-dimensional microliquid chromatography *Journal of Separation Science*, 36 2430-2440
- [112] B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, H. Bergamin, L.C.R. Pessenda (1981) Zone-sampling processes in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 123 221 – 228.
- [113] P. Chocholous, L. Kasarove, D. Satinsky, H. Sklenorova. P. Solich. (2011) Enhanced capabilities of separation in sequential injection chromatography – fused core particle column and its comparison with narrow bore monolithic column. *Talanta* 85 1129 - 1134
- [114] R. de Prá Urio, J.C. Masini, (2015) Evaluation of Sequential Injection Chromatography for reversed phase separation of triazine herbicides exploiting monolithic and core-shell columns. *Talanta* 131 528 – 534
- [115] Jiang, Z., Smith, N. W., Fergusson, P., Taylor, M. R., (2007) Hydrophilic interaction Chromatography using methacrylate-based monolithic capillary column for the separation of polar analytes, *Anal. Chem.* 79 1243-1250
- [116] Lammerhofer, M. (2010) Editorial Letter *J. Sep. Sci.*, 33, 679–680.
- [117] Jiang, Z., Reily, J., Everatt, B., Smith, N., (2009) Novel zwitterionic polyphosphorylcholine monolithic column for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 12 2439-2448,
- [118] Jandera, P., Janás, P., (2017) Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography: A review *Analytica Chimica Acta*, 967, 12-32
- [119] Urban, J., Skeriková, V., (2013) Highly stable surface modification of hypercrosslinked monolithic capillary columns and their application in hydrophilic interaction chromatography *J. Sep. Sci.*, 36, 2806-2812
- [120] Urban, J., Skeriková, V., Jandera, P., Kubickova, R., Pospíšilová, M., Preparation and Characterization of polymethacrylate monolithic capillary columns with dual hydrophilic interaction reversed-phase retention mechanism for polar compounds *J. Sep. Sci.*, 32, 2530-2543

- [121] Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., (2013) Capillary-liquid Chromatography (CLC) and nano-LC in food analysis *Trends in Analytical Chemistry*, 52 226-238
- [122] Hernandez-Borgez, J., Aturki, Z., Rocco, A., Fanalli, S. (2007) Recent applications in nanoliquid chromatography *J. Sep Sci.*, 30, 1589-1610
- [123] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. F. (1992) "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, USA
- [124] Svec, F., Fréchet. J.M.J. (1995) Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of "Molded" Porous Materials with High Flow Characteristics for separation or Catalysis *Chem. Mater.*, 7 707-715

6. ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Luiz Fernando Ribeiro

Local e data de nascimento: Rio Claro, 02 de novembro de 1984

EDUCAÇÃO

Ensino médio: Colégio Méson, Sumaré 2002

Graduação em Química com atribuições tecnológicas, Universidade Estadual de Campinas, 2009

Mestrado em Química. Título da dissertação: Determinação simultânea de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em águas e sedimentos usando análise por injeção sequencial (SIA) com detecção voltamétrica, Orientador: Jorge César Masini. Universidade de São Paulo, 2014

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado – 2010 até 2012

Bolsista de Doutorado – 2014 até 2018

PUBLICAÇÕES

Ribeiro, L. F., Masini, J. C. (2014) Automated determination of Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Zn (II) in environmental samples by square wave voltammetry exploiting sequential injection analysis and screen printed electrodes, *Electroanalysis* 26 2754–2763, <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201400462>

Ribeiro, L. F., Masini, J. C. (2018). Complexing porous polymer monoliths for online solid-phase extraction of metals in sequential injection analysis with electrochemical detection. *Talanta*, 185(February), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.099>

Ribeiro, L.F., Martins, R. L., Costa, D. M. S., Masini, J. C. (2018) Porous monoliths for separations and extractions in sequential injection analysis, *Journal of Separation Science*. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800995>

RESUMO EM CONGRESSO

5º Congresso Analítica. Desenvolvimento de colunas monolíticas poliméricas para extração em fase sólida e pré-concentração de metais potencialmente tóxicos. São Paulo, 2017