Carlos Eduardo Domingues Nazario

Desenvolvimento e caracterização de materiais baseados em sílica com aplicabilidade em extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra alta eficiência

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2013

Dedicatória

A Deus por nunca deixar faltar
tranquilidade e confiança.

Dedico esta tese aos meus pais, Francisco e Cleide Aparecida, e também à minha irmã, Luciana, pelo apoio incondicional, incentivo, compreensão e ajuda durante toda minha vida para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Além disso, dedico à minha namorada, Carla, pelo companheirismo, amor e companhia em todos os momentos. Dedico a vocês por compreender minha ausência durante esse período para que eu pudesse finalizar este trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças por ter me recebido no grupo de Cromatografia, por confiar no meu potencial e também pela orientação, incentivo e apoio durante a realização desta tese;

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pelas sugestões fornecidas no decorrer dos trabalhos;

Aos amigos do CROMA que passaram pelo grupo entre o ano de 2008 até 2012, Lincoln, Alessandra, Ariane, Christian, Paula, Wendell, Gabriela, Flávia, Tiago, Renato, Juliana, Natália, Diana, Paulo, Danielle, Camila Centurion, Bruna, Robson, Rogério e Camila. Gostaria de agradecer também aos amigos do atual grupo, Maraíssa, Meire, Maura, Scarlet, Leidimara, Raquel, Andréia, Tanare, Felipe, Lucas, Rodrigo, Luis Felipe, Diego, Letícia, Leonardo, Daiane, Elaine, Guilherme, Alcimar, Bruno, Patrícia e Odete. Agradeço a todos pelos momentos de discussão de trabalhos científicos, aprendizados e descontração nos bares, churrascos e até na cozinha do laboratório. Foi uma ótima oportunidade para crescimento pessoal e profissional trabalhar e conviver no grupo de pesquisa;

Aos amigos do IIC, Protheus e NST, Elton, Adriana, Luciana, Gustavo, Priscila, Karen, José, Tiago Guerreiro, Tiago Lanças, Maria Inês, e também ao Luis, Esmeraldo e Maria Ângela que já passaram por lá;

Aos meus amigos da república Camilo, Isac e Tiago pelos assuntos extrovertidos, alegres e companheirismo durante esse período;

A todos os meus amigos que conheci em Aparecida D'Oeste/SP, Campo Grande/MS e São Carlos/SP durante a época do colégio, graduação e pós-graduação. Apesar da distância geográfica com alguns, isto não impediu que deixassem de me apoiar e torcer pelo meu sucesso;

Ao Alexandre Cruz da SINC do Brasil e Carlos Cavalheiro da Nova Analítica pela amizade, conselhos e ensinamentos sobre a instrumentação em cromatografia;

Aos meus familiares pelo apoio e força. Agradeço também à família da Carla, seus pais e seu irmão, pela ótima recepção proporcionada;

Aos docentes do IQSC, funcionários da pós-graduação, biblioteca, oficina mecânica, vidraria e central de análises químicas (CAQI) pelo auxílio fornecido em todos os momentos;

Ao Instituto Internacional de Cromatografia (IIC) pela oportunidade de aprendizado;

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pela infraestrutura e auxílios fornecidos;

Ao professor Tiago Venâncio da UFSCar pelas análises de RMN;

Ao grupo da professora Elisabete Moreira Assaf do IQSC/USP pelas análises de BET;

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro em projetos desenvolvidos no grupo;

A todos que de alguma forma contribuíram para que esta tese tenha sido concluída.

*“Challenges are what make life interesting;
overcoming them is what makes life meaningful.”*

-Joshua J. Marine

Resumo

Atualmente, a demanda e a necessidade de metodologias analíticas e bioanalíticas que promovam análise rápida e seletiva tem impulsionado o constante desenvolvimento de sorventes para preparo de amostra e fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Desta maneira, esta tese tem por objetivo desenvolver materiais utilizando precursores de sílica com aplicação em preparo de amostra e suportes cromatográficos para cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC). Foram sintetizadas e caracterizadas duas fases extratoras as quais tiveram sua aplicabilidade demonstrada na extração de fármacos em fluidos biológicos empregando a técnica de extração em fase sólida (SPE). A primeira metodologia desenvolvida foi a síntese de partículas de sílica empregando precursores de baixo custo (silicato de sódio) pelo método sil-gel. Após a funcionalização com grupamento C18, e caracterização da fase extratora, o material sintetizado foi aplicado em SPE *off-line* para a determinação de fluoxetina e seu metabólito, norfluoxetina, em plasma humano por HPLC-UV. O método desenvolvido foi validado e aplicado em amostra de plasma de pacientes sob tratamento de fluoxetina. Além disso, o sorvente desenvolvido apresentou resultados similares quando comparado com fases extratoras comerciais. O segundo método desenvolvido utilizou a técnica de impressão molecular (MIP) a qual tem se tornado uma fase extratora atrativa devido a sua maior seletividade em relação as fases típicas empregadas em SPE. Ao mesmo tempo, o uso de SPE *online* com MIP (MISPE) é uma alternativa atraente no preparo de amostra, pois é simples, diminui o tempo total da análise, necessita de pequena quantidade de amostra, e pode ser automatizado. Assim, MIP amino-funcionalizado pelo processo sol-gel utilizando ibuprofeno como *template* foi sintetizado. Para comparação, o polímero não impresso (NIP) foi preparado nas mesmas condições, sem a presença do *template*. As análises por cromatografia líquida foram realizadas utilizando uma coluna de extração MIP e uma coluna analítica em fase reversa configuradas para operar no modo SPE *online* por *column switching*. O método desenvolvido, MISPE-HPLC-UV, foi validado e aplicado na extração seletiva de cinco anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) em urina humana com um tempo total de análise de 22 minutos. Além dos materiais voltados para preparo de amostra, foi avaliado a síntese e caracterização de suporte cromatográfico baseado em sílica com diâmetro de partícula abaixo de 2 μm com aplicabilidade em análises rápidas em cromatografia (UHPLC). Nesta vertente, partículas de sílica esférica não porosa (0,9 μm) foram sintetizadas pelo método sol-gel com DPR abaixo de 10 %. As partículas foram funcionalizadas com o grupamento C18 (ODS) e submetidas posteriormente ao processo de *endcapping* (TMS) para operar em modo reverso. Métodos físico-químicos de caracterização foram utilizados para determinar a morfologia, área superficial e quantidade de carbono na superfície do material. Adicionalmente, as técnicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear forneceram informações sobre a estrutura da sílica e das ligações após a funcionalização. A fase estacionária foi empacotada em uma coluna (40 mm x 0,25 mm) e a sua aplicabilidade foi avaliada em cromatografia líquida capilar (cLC). Apesar de não alcançar a eficiência ótima da separação cromatográfica devido a limitação instrumental, a fase estacionária sub 1 μm apresenta potencial para separações rápidas sem perda de eficiência.

Abstract

Currently, the demand and need for bioanalytical and analytical methodologies that promotes rapid and selective analysis has stimulated the development of sorbents for sample preparation and stationary phases for high performance liquid chromatography (HPLC). Therefore, this thesis aims to develop materials using silica precursors with application in sample preparation and chromatographic supports for ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). Thus, in this study two sorbents were synthesized and characterized and their applicability was demonstrated in the extraction of drugs in biological fluids employing the solid phase extraction technique (SPE). The first method developed was the synthesis of silica particles employing low cost precursors (sodium silicate) using the sol-gel method. After functionalization with C18 group and characterization of the extraction phase, the synthesized material was applied to SPE off-line for the determination of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in human plasma by HPLC-UV. The method was validated and applied to plasma samples from patients treated with fluoxetine. Furthermore, the labmade sorbent presented similar results when compared with commercial ones. The second method developed used the molecular imprinting technique (MIP) that has become an attractive sorbent due to its greater selectivity over the typical phases employed in SPE. At the same time, the use of online SPE with MIP (MISPE) is an attractive alternative in sample preparation because it is simple, reduces the total time of analysis, needs little amount of sample and can be automated. Thus, MIP amino-functionalized by the sol-gel method using ibuprofen as template was synthesized. For comparison, the non-imprinted polymer (NIP) was prepared under the same conditions without the presence of template. LC analysis was performed using a MIP extraction column and a reverse phase analytical column in order to perform column switching on-line sample separation. The developed method, MISPE-HPLC-UV, was validated and applied to the selective extraction of five anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in human urine with a total analysis time of 22 minutes. Moreover it was evaluated the synthesis and characterization of chromatographic support based on silica with particle diameter under 2 μm with applicability in fast LC analysis (UHPLC). In this instance, spherical particles of non-porous silica (0.9 μm) were synthesized by sol-gel method with RSD below 10 %. The particles were functionalized with the C18 group and submitted to the endcapping process with TMS to operate in reverse phase mode. Physico-chemical methods were used to determine the morphology, surface area and amount of carbon in the silica surface. Additionally, the infrared and nuclear magnetic resonance techniques provided information about the structure of silica and bonds after the functionalization step. The stationary phase was packed into a column (40 mm x 0.25 mm), and its applicability was evaluated in capillary liquid chromatography (cLC). Although optimum chromatographic efficiency was not achieved separation due to instrumental limitations, the sub 1 μm stationary phase has potential for rapid separations without loss of efficiency.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Etapas envolvidas no desenvolvimento de metodologia analítica.....	27
Figura 2.1 – Formatos tipicamente empregados em SPE.....	35
Figura 2.2 – Modos de integração entre o preparo de amostra e o sistema de separação e detecção.....	36
Figura 2.3 - Etapas envolvidas no processo SPE off-line. (1) Condicionamento do cartucho de extração, (2) Aplicação da amostra, (3) Remoção dos interferentes (clean up) e (4) eluição dos analitos.....	37
Figura 2.4 – Representação esquemática da técnica bidimensional por <i>column switching</i> aplicada em LC. Posição de carregamento da amostra (A) e posição de eluição da amostra (B)	38
Figura 2.5 – Estrutura de sorventes baseados em sílica.....	39
Figura 2.6 – Fase extratora polimérica apolar PS-DVB.....	40
Figura 2.7 – Esquema geral de modificação da fase polimérica PS-DVB.....	41
Figura 2.8 – Estrutura polimérica da fase extratora Oasis HLB comercializada pela Waters.....	42
Figura 2.9 – Estrutura de fases baseadas em carbono. (A) carbono poroso grafitado, (B) nanotubos de carbono de parede simples (<i>single-walled carbon nanotube</i> – SWCNT) e (C) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (<i>multi-walled carbon nanotube</i> – MWCNT).....	42
Figura 2.10 – Representação da fase extratora RAM.....	43
Figura 2.11 – Representação de fase extratora baseada em imunoafinidade.....	44
Figura 2.12 - Ilustração esquemática de preparo do MIP.....	44
Figura 2.13 – Esquema geral de um equipamento de HPLC. (A) bomba, (B) sistema de introdução de amostra, (C) forno cromatográfico, (D) coluna, (E) sistema de detecção, (F) descarte/coleta da amostra e (G) sistema de aquisição de dados.....	47
Figura 2.14 – Representação cromatográfica que ilustra a evolução da HPLC ao longo dos anos.....	48
Figura 2.15 – Formato dos suportes cromatográficos. (A) partículas porosas e irregulares, (B) partícula pelicular esférica, (C) partícula esférica porosa, (D) partícula esférica não porosa, (E) partícula superficialmente porosa e (F) monólito.....	51
Figura 2.16 – Característica estrutural de uma coluna particulada (A) e monolítica (B).....	53
Figura 2.17 – Etapas do processo sil-gel: hidrólise e condensação.....	56
Figura 2.18 – Representação da formação da sílica gel. (A) formação das partículas primárias, (B) aumento de tamanho das partículas primárias e (C) formação do hidrogel.....	56
Figura 2.19 – Influência do pH no tempo de gelificação no processo sil-gel.....	57

Figura 2.20 – Processo de maturação de Ostwald.	58
Figura 2.21 – Etapa de hidrólise e condensação no processo sol-gel.	59
Figura 2.22 – Representação da dispersão das partículas no experimento de aumento do diâmetro. (A) crescimento monodisperso e (B) crescimento com formação de partículas secundárias.	60
Figura 2.23 – Esquema da geração e consumo do intermediário sintético no processo de crescimento de partícula.	60
Figura 2.24 – Microscopia de partículas de sílica obtidas pelo método de microencapsulação.	62
Figura 2.25 – Método de secagem por nebulização. (A) representação esquemática do equipamento de <i>spray drying</i> e (B) processo de nebulização e secagem da suspensão coloidal.	62
Figura 2.26 – Representação do preparo de sílica híbrida. (A) sílica híbrida com grupamento hidreto na superfície, (B) sílica híbrida com ligações silício-metil, (C) sílica híbrida com ligações de etano e (D) sílica híbrida com um organossilano na superfície.	64
Figura 2.27 – Grupos silanois presente na superfície da sílica.	67
Figura 2.28 – Obtenção de fase estacionária quimicamente ligada. (A) reação de esterificação, (B) reação com SOCl_2 , (C) reação de organossilanização com reagente monofuncional, (D) reação de organossilanização com reagente difuncional e (E) reação do hidreto com grupo alquílico.	68
Figura 2.29 – Representação de algumas fases estacionárias quimicamente ligadas no suporte cromatográfica baseado em sílica.	69
Figura 2.30 - Representação de fases estacionárias utilizadas em HPLC	71
Figura 2.31 - Cromatograma ilustrativo de parâmetros cromatográficos de uma análise.	71
Figura 2.32 - Gráfico representativo da curva de van Deemter.	74
Figura 2.33 – Influência do fator de retenção, fator de separação e número de pratos sobre a resolução cromatográfica.	75
Figura 2.34 - Representação esquemática da determinação do fator de assimetria e alargamento do pico cromatográfico.	76
Figura 2.35 – Relação sinal-ruído (S/R).	77
Figura 3.1 - Estrutura química da fluoxetina (1), norfluoxetina (2) e clomipramina (3) - padrão interno.	86
Figura 3.2 – Esquema geral da síntese da sílica C18.	92
Figura 3.3 – MEV das partículas de sílica obtidas para SPE na faixa de 38 - 72 μm	93
Figura 3.4 – MEV das partículas de sílica obtidas abaixo de 38 μm	94
Figura 3.5 – MEV das partículas de sílica obtidas sem a remoção dos metais.	94

Figura 3.6 – EDS das partículas de sílica obtidas para SPE na faixa de 38 - 72 μm	95
Figura 3.7 - Espectro de infravermelho da sílica pura e sílica C18. Bandas: (1) O-H, (2) C-H, (3) O-H, (4) Si-O-Si, (5) Si-OH, (6) Si-O e (7) Si-O.	96
Figura 3.8 – Nomenclatura das espécies de sílica. Silício ligado ao carbono (M); silanol geminal (Q^2); silanol isolado (Q^3) e siloxano (Q^4).	97
Figura 3.9 – Espectro de ^{29}Si RMN/CP/MAS da sílica sintetizada antes da funcionalização (A) e após a funcionalização (B).	97
Figura 3.10 – Espectro de ^{13}C RMN/CP/MAS/TOSS da sílica C18 sintetizada.	98
Figura 3.11 – Estrutura química dos PAHs. (1) fenantreno, (2) antraceno e (3) criseno.	99
Figura 3.12 – Perfil cromatográfico da separação dos PAHs em solvente (vermelho) e após a extração em água (preto). Ordem de eluição: fenantreno (1), antraceno (2) e criseno (3).	100
Figura 3.13 – Cromatograma da separação cromatográfica da norfluoxetina (1), fluoxetina (2) e clomipramina (3) na concentração de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	101
Figura 3.14 – Cromatograma da separação cromatográfica de amostras de plasma com 250 ng mL^{-1} de norfluoxetina (1) e fluoxetina (2) utilizando a clomipramina (3) como padrão interno (500 ng mL^{-1}).	102
Figura 3.15 – Cromatograma do branco do plasma extraído.	103
Figura 3.16 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos na análise de FLX em plasma...	104
Figura 3.17 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtido na análise de NFLX em plasma.	105
Figura 3.18 - Cromatograma do plasma fortificado com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FLX e NFLX e amostra real com FLX (129,66 ng mL^{-1}) e NFLX (181,97 ng mL^{-1}) contendo 500 ng mL^{-1} de CLO.	109
Figura 3.19 – Comparação da extração de plasma fortificado com diferentes sorventes.	110
Figura 4.1 - Número de publicações relacionadas com MIP a partir de 1980.	116
Figura 4.2 - Distribuição das publicações relacionadas com MIP.	116
Figura 4.3 - Representação das estratégias de impressão covalente e não- covalente.	117
Figura 4.4 – Representação de sítios seletivos de MIP baseado em ligação covalente reversível com derivado do ácido borônico (A), aldeídos (B) e alcoóis (C).	117
Figura 4.5 – Reagentes tipicamente usados na síntese dos MIPs baseados por interações não-covalente utilizando precursores orgânicos.	119
Figura 4.6 – Representação esquemática da síntese do MIP pelo processo sol-gel.	120
Figura 4.7 - Esquema da hidrólise e condensação no processo sol-gel.	121
Figura 4.8 - Precursores trialcóxissilanos frequentemente usados no processo sol-gel.	121
Figura 4.9 - Monômeros orgânicos aplicados na formação de materiais híbridos sol-gel/orgânico.	122
Figura 4.10 – Representação esquemática da síntese de MIP amino funcionalizado.	122

Figura 4.11 – Representação esquemática da síntese de MIP híbrido (orgânico-inorgânico).	123
Figura 4.12 - Estrutura química dos NSAIDs estudados.	125
Figura 4.13 - Fotografia do sistema <i>online</i> . A) Vista completa do arranjo <i>online</i> dentro do forno cromatográfico e B) ampliação da válvula de seis vias e da coluna de extração.	135
Figura 4.14 - Configuração do sistema <i>online</i> para eluição no modo <i>foreflush</i>	135
Figura 4.15 - Configuração do sistema <i>online</i> para eluição no modo <i>backflush</i>	136
Figura 4.16 - Esquema sugerido para a preparação do MIP.	141
Figura 4.17 - Imagem de MEV da superfície da sílica ativada (A) e do MIP sintetizado (B).	141
Figura 4.18 - Espectro de Infravermelho da sílica gel, MIP e NIP. Bandas: (1) O-H, (2) N-H, (3) C-H, (4) O-H, (5) N-H, (6) Si-O-Si, (7) Si-OH, (8) Si-O e (9) Si-O.	143
Figura 4.19 - Cromatograma da separação dos fármacos utilizando acetonitrila e metanol como fase móvel. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5).	144
Figura 4.20 - Cromatograma da injeção direta da urina na coluna MIP no arranjo unidimensional.	145
Figura 4.21 - Cromatograma da urina fortificada com os fármacos no modo de injeção <i>foreflush</i> e <i>backflush</i> . Ordem de eluição: Cetoprofeno (1), Naproxeno (2), Fenoprofeno (3), Flurbiprofeno (4) e Ibuprofeno (5).	146
Figura 4.22 - Cromatograma do branco da urina e da urina fortificada com os fármacos no nível médio. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5).	148
Figura 4.23 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o cetoprofeno.	149
Figura 4.24 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o naproxeno.	150
Figura 4.25 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o flurbiprofeno.	151
Figura 4.26 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o ibuprofeno.	152
Figura 4.27 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez na concentração dos fármacos. ...	159
Figura 4.28 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez na área absoluta dos fármacos. ...	160
Figura 4.29 - Cromatograma do branco da urina fortificada com os interferentes e monitorados nos comprimentos de onda de 220 e 254 nm.	162
Figura 4.30 – Cromatograma do íon extratido no modo MS da extração <i>online</i> dos NSAIDs (500 ng mL ⁻¹) fortificados em água (sinal mais intenso) e urina humana diluída em água (sinal menos intenso).	167
Figura 5.1 – Representação hipotética da curva de van Deemter com diferentes diâmetros de partícula.	173

Figura 5.2 - Pressão requerida (eixo esquerdo) e tempo de análise (eixo direito) em função do tamanho da partícula.....	174
Figura 5.3 – Separação de alquilbenzenos utilizando colunas com diferentes tamanho de partículas sob condições isocráticas.	175
Figura 5.4 – Separação de compostos barbituricos em coluna capilar (150 mm x 50 µm x 1,0 µm, C18 não poroso) com temperatura de 80°C.	177
Figura 5.5 – Separação cromatográfica em diferentes pressões. Coluna (150 mm x 1,0 mm x 1,5 µm, C18).....	177
Figura 5.6 - MEV das partículas de sílica obtidas após adaptações no procedimento experimental.	183
Figura 5.7 – Microscopia das partículas de sílica obtidas pelo método de Stober com a razão molar TEOS:NH ₄ OH de (A) 1:0,5, (B) 1:1, (C) 1:1,5 e (D) 1:2.	184
Figura 5.8 – Microscopia da partícula de sílica sintetizada com razão molar TEOS:NH ₄ OH de 1:20.	185
Figura 5.9 – Microscopia das partículas de sílica sintetizadas de acordo com as condições especificadas na Tabela 5.3.	186
Figura 5.10 – MEV das partículas de sílica submetidas ao processo de crescimento da partícula semente.	188
Figura 5.11 – MEV e distribuição das partículas obtidas no processo de crescimento de partícula semente. (A) partícula semente, (B) após 4 adições de 2,2 mmol de TEOS, (C) após 8 adições de 2,2 mmol de TEOS e (D) após 12 adições de 2,2 mmol de TEOS.....	190
Figura 5.12 – MEV das partículas sintetizadas com a alimentação realizada com bomba peristáltica. (A) imersão direta na suspensão e (B) sistema de gotejamento na suspensão....	191
Figura 5.13 – (A) MEV das partículas de sílica sintetizadas, (B) Histograma da distribuição das partículas e (C) Gráfico da percentagem acumulada das partículas.....	192
Figura 5.14 - Espectro de Infravermelho da sílica pura e sílica C18. Bandas: (1) O-H, (2) C-H, (3) O-H, (4) Si-O-Si, (5) Si-OH, (6) Si-O e (7) Si-O.	193
Figura 5.15 – Espectro da sílica C18 não porosa sintetizada. (A) ²⁹ Si RMN/CP/MAS e (B) ¹³ C RMN/CP/MAS/TOSS.	195
Figura 5.16 – Esquema de um tubo preparado para a confecção de coluna capilar empacotada.	196
Figura 5.17 – Imagem da coluna capilar desenvolvida (40 mm x 250 µm x 0,9 µm, C18)...	196
Figura 5.18 – Cromatograma obtido na separação da solução teste utilizando a coluna capilar com a fase estacionária C18 sub-1 µm. Ordem de eluição: uracila (1), fenol (2), difenilamina (3), naftaleno (4) e acenaftileno (5).	197

Figura 5.19 – Cromatograma obtido na separação dos NSAIDs na concentração de 100 mg L⁻¹ utilizando a coluna capilar com a fase estacionária C18 sub-1 µm. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5)..... 199

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Classificação da cromatografia líquida de acordo com o diâmetro interno das colunas e o intervalo de vazão da fase móvel.....	49
Tabela 2.2 –Diminuição do tamanho das partículas em LC.....	54
Tabela 2.3 – Efeitos e variações na robustez avaliada pelo método de Youden.....	79
Tabela 2.4 - Matriz de Youden.....	80
Tabela 2.5 - Parâmetros cromatográficos recomendados durante a validação.....	81
Tabela 3.1 – Custo estimado dos precursores de sílica.....	85
Tabela 3.2 – Análise elementar das partículas de SPE <i>labmade</i>	95
Tabela 3.3 - Dados da curva analítica.....	103
Tabela 3.4 - Precisões obtidas para o método desenvolvido (n = 3).....	106
Tabela 3.5 - Exatidões obtidas para o método desenvolvido (n = 3).....	106
Tabela 3.6 – Recuperação e efeito matriz para o método desenvolvido (n = 3).....	107
Tabela 3.7 - Resultados da avaliação da robustez (n = 3).....	107
Tabela 3.8 – Concentração de fluoxetina e norfluoxetina em plasma de pacientes sobre tratamento.....	108
Tabela 3.9 – Característica dos sorventes avaliados.....	109
Tabela 3.10 – Comparativo de recuperação utilizando a fase extratora desenvolvida no trabalho e duas comerciais (n = 3).....	110
Tabela 4.1 – Métodos de MISPE-LC <i>online</i>	126
Tabela 4.2 - Eventos realizados durante as etapas de preparo de amostra e separação cromatográfica.....	137
Tabela 4.3 - Fatores avaliados na robustez do método.....	139
Tabela 4.4 - Matriz de Youden.....	139
Tabela 4.5 - Parâmetros cromatográficos da separação.....	146
Tabela 4.6 - Parâmetros da curva analítica para os anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) - cetoprofeno (CET), ibuprofeno (IBU), fenoprofeno (FEN), flurbiprofeno (FLU) e o naproxeno (NAP) (n = 30).....	147
Tabela 4.7 - Precisão para o método de análise de NSAIDs em urina (n = 5).....	153
Tabela 4.8 - Exatidão para o método de análise de NSAIDs em urina (n = 5).....	154
Tabela 4.9 - Recuperações obtidas para os NSAIDs (n = 5).....	155
Tabela 4.10 - Avaliação do efeito matriz (n = 6).....	156
Tabela 4.11 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial (n = 6).....	157
Tabela 4.12 - Avaliação da injeção direta e diluição da urina (n = 5).....	157
Tabela 4.13 - Resultados da avaliação da robustez (n = 3).....	158

Tabela 4.14 - Avaliação de interferentes na análise dos NSAIDs.	161
Tabela 4.15 - Estabilidade de curta duração da amostra fortificada (n = 3).	162
Tabela 4.16 - Estabilidade pós-processamento da amostra fortificada (n = 3).	163
Tabela 4.17 - Estabilidade da amostra após ciclos de congelamento/descongelamento (n = 3).	163
Tabela 4.18 - Estabilidade de longa duração da amostra fortificada (n = 3).	164
Tabela 4.19 - Concentrações dos NSAIDs em urina após administração de comprimidos. ..	165
Tabela 4.20 - Amostras de controle de qualidade.	166
Tabela 5.1 – Correlação entre os parâmetros dependentes e independentes.	171
Tabela 5.2 – Proporções dos reagentes utilizados no processo sintético.	180
Tabela 5.3 – Diâmetro de partícula e desvio padrão relativo dos experimentos de acordo com a condição experimental utilizada.	185
Tabela 5.4 - Avaliação da repetibilidade do preparo da partícula.	187
Tabela 5.5 – Comparação da distribuição das partículas de sílica antes e depois da reação de crescimento de partícula semente.	191
Tabela 5.6 – Parâmetros cromatográficos para a coluna sintetizada.	198

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

4-VP – 4-vinilpiridina

ACN – acetonitrina

AIBN – 2,2'-azobisisobutironitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APTES – aminopropiltrietoxissilano

As – assimetria do pico

ASE – extração acelerada com solvente

BET – Brunauer-Emmett-Teller

CET – cetoprofeno

cLC – cromatografia líquida capilar

CLO – clomipramina

Cox – cicloxigenase

CP – polarização cruzada

CQ – amostra de controle de qualidade

CQA – amostra de controle de qualidade de alta concentração

CQB – amostra de controle de qualidade de baixa concentração

CQ-LIQ – amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação

CQM – amostra de controle de qualidade de média concentração

Cs – concentração de saturação

Cs* – concentração limite de saturação

CTAC – cloreto de hexadeciltrimetilamônio

CyD - β -ciclodextrina

DAD – detector de arranjo de diodos

D_m – difusão do analito na fase móvel

DP – desvio padrão

dp – diâmetro da partícula

DPR – desvio padrão relativo

D_s – difusão do analito na fase estacionária

DVB – divinilbenzeno

ECD – detector eletroquímico

EDMA – etilenoglicol dimetacrilato

EDS/EDX – espectroscopia de energia dispersiva
EMEA – *European Medicine Agency*
ETEOS – etiltriethoxissilano
exp – experimento
Fc – vazão da fase móvel
FDA – *Food and Drug Administration*
FEN – fenoprofeno
FEQL – Fase estacionária quimicamente ligada
FLD – Detector de fluorescência
FLU – flurbiprofeno
FLX – Fluoxetina
FT-IR – espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier
g – força gravitacional
GC – cromatografia gasosa
H – altura equivalente a um prato
h – altura reduzida do prato
HEMA – 2-hidroxietil metacrilato
HILIC – cromatografia de interação hidrofílica
HLB – *hydrophilic-lipophilic balanced*
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
HRGC - cromatografia gasosa de alta resolução
IBU – ibuprofeno
IBU-d₃ – ibuprofeno deuterado
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
k – fator de retenção
L – comprimento da coluna
LC – cromatografia líquida
LD – limite de detecção
LIQ – limite inferior de quantificação
LLE – extração líquido-líquido
LPME – microextração em fase líquida
LQ – limite de quantificação
LSQ – limite superior de quantificação
MAA – Ácido metacrílico

MAE – extração assistida por micro-ondas
MAS – rotação no ângulo mágico
MBAA – n,n-metileno-bis-acrilamida
MeOH – metanol
MEPS – microextração por sorbente empacotado
MEV – microscopia eletrônica de varredura
min – minuto
MIP – polímero molecularmente impresso
MISGMs - materiais sol-gel molecularmente impressos
MISPE – extração em fase sólida com polímero impresso
MS – espectrometria de massas
MSPD – dispersão da matriz em fase sólida
MWCNT – nanotubos de carbono de parede múltiplas
N – número de pratos
NAP – naproxeno
NCT – nanotubo de carbono
NFLX – norfluoxetina
NIP – polímero não impresso
NP – fase normal
NR – não reportado
NSAID – anti-inflamatório não esteroidal
ODS – clorodimetiloctadecilssilano
PAH/HPA – hidrocarboneto policíclico aromático
PG – prostaglandina
PGC – carbono grafitado poroso
PI – padrão interno
ppm – deslocamento químico
PS-DVB – poliestireno-divinilbenzeno
RAM – meio de acesso restrito
RMN – ressonância magnética nuclear
RP – fase reversa
Rs – resolução cromatográfica
SAX – trocador aniônico forte
SBSE – extração por sorção em barra de agitação

SCX – trocador catiônico forte

SFC – cromatografia com fluido supercrítico

SFE – extração com fluido supercrítico

SPE – extração em fase sólida

SPME – microextração em fase sólida

SWCNT – nanotubos de carbono de parede simples

SWE – extração com água sub-crítica

T – temperatura

TEA – trietilamina

TEOS – tetraetilortosilicato

TES – trietoxissilano

TF – fator de alargamento

TFMAA – ácido trifluorometacrilato

THF – tetrahidrofurano

t_m – tempo morto

TMOS – tetrametilortosilicato

TMS – trimetilclorossilano

TOF – analisador tempo de voo

TOSS – supressão das bandas laterais

t_R – tempo de retenção

TRIM – trimetilopropano trimetacrilato

u – velocidade linear

UHPLC – cromatografia líquida de ultra alta eficiência

UV – ultravioleta

v – velocidade linear reduzida

$\bar{x}$ – concentração média calculada

WAX – trocador aniônico fraco

w_b – largura da base

WCX – trocador catiônico fraco

α – fator de separação

η – viscosidade da fase móvel

γ – constante relacionada ao empacotamento da coluna

$\propto$ – proporcional

Sumário

Capítulo 1	25
Introdução	25
1.1 Introdução e justificativa.....	27
1.2 Objetivo geral do projeto	28
1.2.1 Objetivos específicos	29
Capítulo 2	31
Revisão bibliográfica	31
2.1 Preparo de amostra.....	33
2.1.1 Extração em fase sólida	33
2.1.1.1 Mecanismos de separação.....	34
2.1.1.2 Formato	34
2.1.1.3 Modo de integração da extração em fase sólida	36
2.1.1.4 Fases extratoras	39
2.2 Técnicas de separação.....	45
2.2.1 Desenvolvimento e evolução da cromatografia líquida.....	45
2.2.2 Evolução dos suportes cromatográficos em LC.....	51
2.2.3 Suporte cromatográfico em LC.....	54
2.2.4 Fases estacionárias	66
2.3 Parâmetros cromatográficos em HPLC	70
2.4 Validação de metodologia.....	76
Capítulo 3	83
Determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano por HPLC-UV utilizando a técnica de SPE com sorvente C18 sintetizado com precursores de sílica de baixo custo	83
3.1 Introdução	85
3.2 Fármacos antidepressivos	85
3.3 Objetivos	87
3.4 Parte experimental	87
3.4.1 Materiais e reagentes.....	87
3.4.2 Síntese e caracterização das partículas C18.....	87
3.4.2.1 Preparação de partículas de sílica	87
3.4.2.2 Funcionalização das partículas de sílica	88

3.4.2.3 Caracterização físico-química.....	88
3.4.3 Aplicabilidade das partículas de sílica C18 <i>labmade</i> em extração em fase sólida	89
3.4.3.1 Preparo das soluções.....	89
3.4.3.2 Tratamento das amostras de plasma	89
3.4.3.3 Método cromatográfico.....	90
3.4.3.4 Validação do método	91
3.4.3.5 Determinação do fármaco em amostras de plasma humano	92
3.5 Resultados e discussão.....	92
3.5.1 Síntese e caracterização da sílica C18	92
3.5.2 Avaliação da fase extratora.....	99
3.5.3 Aplicação das partículas <i>labmade</i> na análise de antidepressivo	100
3.5.3.1 Desenvolvimento do método de análise	100
3.5.3.2 Validação do método	103
3.5.3.3 Determinação do fármaco em amostras de plasma humano	108
3.5.3.3 Estudo comparativo com fases comerciais baseadas em sílica.....	108
3.6 Conclusão.....	111
Capítulo 4	113
Emprego de MISPE-HPLC-UV na determinação <i>online</i> de anti-inflamatórios não esteroidais em urina humana.....	113
4.1 Introdução	115
4.1.1 Polímero molecularmente impresso.....	115
4.1.2 Aplicações dos polímeros molecularmente impressos em preparo de amostra	124
4.1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais	125
4.2 Objetivos	132
4.3 Experimental	132
4.3.1 Reagentes	132
4.3.2 Síntese do MIP	133
4.3.3 Caracterização do MIP	133
4.3.4 Preparo da coluna MIP	134
4.3.5 Método cromatográfico.....	134
4.3.6 Preparo das soluções padrões para a validação.....	136
4.3.7 Validação do método	137
4.3.8 Determinação dos fármacos em amostras de urina	140
4.4 Resultados e discussão.....	140

4.4.1 Preparo e caracterização do MIP	140
4.4.2 Separação cromatográfica	142
4.4.3 Validação do método	147
4.4.4 Determinação dos fármacos em amostras de urina	164
4.5 Aplicação do método MISPE-LC-MS/TOF	166
4.6 Conclusão.....	168
Capítulo 5	169
Preparo e avaliação de partículas de sílica sub 1 µm com aplicabilidade em cromatografia líquida de ultra alta eficiência	169
5.1 Introdução	171
5.2 Objetivos	179
5.3 Experimental	179
5.3.1 Materiais e reagentes.....	179
5.3.2 Síntese da partícula de sílica	179
5.3.3 Funcionalização das partículas de sílica	181
5.3.4 Caracterização físico-química.....	181
5.3.5 Método cromatográfico.....	182
5.4 Resultados e discussões	182
5.4.1 Síntese da partícula de sílica	182
5.4.2 Caracterização das partículas	193
5.4.3 Avaliação cromatográfica das partículas de sílica	195
5.5 Conclusão.....	199
Capítulo 6	201
Conclusão geral e perspectivas futuras	201
6.1 Conclusão geral.....	203
6.2 Perspectivas futuras	203
Referências.....	205

Capítulo 1

Introdução

1.1 Introdução e justificativa

Um método analítico utilizando técnicas cromatográficas pode ser subdividido em etapas como apresentado na Figura 1.1. Assim, entre a informação inicial necessária para realizar o trabalho (analito alvo, matriz, técnica de preparo de amostra e análise) e o resultado encontram-se as etapas de amostragem, preparo de amostra, análise cromatográfica e processamento dos dados.

Atualmente, mais de 80 % dos trabalhos publicados na literatura abordando o preparo de amostras e análise cromatográfica estão voltadas para a aplicação da metodologia analítica em análises ambiental, biológica, industrial, farmacêutica, entre outras.

Apesar de minoritários, estudos de desenvolvimento de equipamentos analíticos, dispositivos e sorventes para preparo de amostra, suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida vêm sendo conduzidos por pesquisadores da área acadêmica e industrial, sempre objetivando aprimorar o desempenho analítico.

Neste contexto, o grupo de cromatografia do Instituto de Química de São Carlos já desenvolveu diversos trabalhos aplicando esse conceito de pesquisa, além de realizar estudos comparativos e de aplicabilidade das técnicas comumente empregadas no preparo de amostra e separações cromatográficas. (1-13) Assim, esta tese de doutorado possui o enfoque no desenvolvimento de materiais objetivando o aprimoramento da etapa de preparo de amostra e análise cromatográfica (especificamente, a HPLC), através da síntese de materiais à base de sílica.

Para fins didáticos, esta tese foi dividida em capítulos para a melhor compreensão das estratégias e metodologias utilizadas.

O Capítulo 1 aborda de forma geral, a contextualização desta tese e também a justificativa e o objetivo geral do trabalho.

Figura 1.1 - Etapas envolvidas no desenvolvimento de metodologia analítica.

O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura no qual compreende informações sobre os temas abordados nesta tese. Assim, neste capítulo, são discutidas as técnicas de preparo de amostra, princípios teóricos da cromatografia, desenvolvimento e evolução da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), estratégias de integração entre o preparo de amostra e a análise cromatográfica, e aspectos sobre validação de metodologias analíticas. Adicionalmente, são discutidos métodos de síntese de materiais baseados em sílica e as estratégias de funcionalização dos suportes cromatográficos na obtenção de fases estacionárias.

O Capítulo 3 aborda a síntese e caracterização de sorvente baseado em sílica empregando precursores de baixo custo (silicato de sódio) para uso como fase extratora em SPE. A aplicabilidade do suporte cromatográfico após sua funcionalização operando em fase reversa com o grupamento C18 foi demonstrada na extração do fármaco fluoxetina e seu principal metabólito, norfluoxetina, em plasma humano.

O Capítulo 4 descreve a síntese e caracterização de fases extratoras baseadas na tecnologia de impressão molecular utilizando a rota sintética sol-gel com enfoque no aumento da seletividade na etapa de extração. Nesse capítulo, descreve-se um método de análise dos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais em urina humana usando sistema *online* por *column switching* (MISPE-HPLC-UV). Além disso, também é avaliada a hifenação do sistema automatizado com a espectrometria de massas em tandem (MISPE-HPLC-MS/TOF).

O Capítulo 5 relata as estratégias cromatográficas empregadas para a diminuição do tempo de análise sem comprometimento da resolução cromatográfica. Nesse capítulo é abordada a síntese e caracterização (físico-química e cromatográfica) de materiais baseados em sílica com aplicação em cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC).

O Capítulo 6 possui as conclusões gerais desta tese e as possibilidades de continuidade do trabalho desenvolvido.

1.2 Objetivo geral do projeto

Esta tese tem por objetivo geral desenvolver materiais baseados em sílica com aplicabilidade na etapa de preparo de amostra e também na análise cromatográfica (HPLC).

1.2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar (quimicamente e morfologicamente) suportes cromatográficos baseados em sílica com aplicação em métodos de preparo de amostra (SPE), utilizando precursores de baixo custo. Adicionalmente, sintetizar materiais baseados em sílica com a tecnologia de impressão molecular (MIP) buscando elevar a seletividade da extração;
- Desenvolver e caracterizar partículas de sílica sub 2 μm com aplicabilidade em cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) visando análises rápidas sem perder eficiência de separação;
- Utilizar os suportes cromatográficos desenvolvidos para preparar e caracterizar fases estacionárias quimicamente ligadas;
- Demonstrar a aplicabilidade dos materiais desenvolvidos.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2.1 Preparo de amostra

Nos últimos anos, houve um grande desenvolvimento da cromatográfica com o objetivo de melhorar a resolução cromatográfica e diminuir o tempo de análise. Um exemplo disso são os equipamentos de cromatografia gasosa rápida (*fast GC*) e ultrarrápida (*ultra fast GC*). (14, 15) Em cromatografia líquida temos as colunas monolíticas, colunas com tecnologia *core-shell* e colunas com partículas sub-2 µm utilizadas em cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC). (16, 17)

Já a etapa do preparo de amostra, a qual antecede a análise cromatográfica, também evoluiu ao longo dos anos; contudo, não no mesmo ritmo que a análise cromatográfica. (17) Assim, o tempo gasto na etapa do preparo de amostra pode representar até 60 % do tempo total de uma análise e é a principal fonte de erros devido a muitas etapas de manipulação da amostra. (18)

Os métodos de preparo de amostra são etapas fundamentais no desenvolvimento dos métodos analíticos e bioanalíticos, pois é através deles que os compostos de interesse são separados dos interferentes provenientes da matriz.

Atualmente existem diversas técnicas que podem ser empregadas no preparo de amostras. Podemos citar a extração líquido-líquido (LLE), extração por soxhlet, extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSDP) extração com fluido supercrítico (SFE), extração acelerada com solvente (ASE), extração com água sub-crítica (SWE) e extração assistida por microondas (MAE). Temos ainda as técnicas miniaturizadas como, por exemplo, a microextração em fase sólida (SPME), extração por sorção em barra de agitação (SBSE), microextração por sorbente empacotado (MEPS) e microextração em fase líquida (LPME).

Nesse escopo de métodos de preparo de amostra, podemos destacar a SPE, a qual é uma técnica versátil, bem estabelecida, e que tem sido muito utilizada em métodos analíticos e bioanalíticos. (19)

2.1.1 Extração em fase sólida

No mercado atual, inúmeras empresas desenvolvem e comercializam produtos para SPE. Entre as décadas de 1960 e 1980 houve intensas pesquisas na busca de novos materiais sortivos. O uso desses materiais em procedimentos analíticos estimulou o desenvolvimento da SPE que vem ocorrendo por mais de 30 anos. O início da SPE aconteceu no ano de 1977 no

qual a empresa Waters disponibilizou comercialmente cartuchos de SPE contendo sorventes baseados em sílica. Dois anos mais tarde (1979) foi colocado no mercado o formato tipo seringa e nos primeiros anos da década de 1980 foram realizadas as primeiras aplicações de pré-colunas para a extração *online* integrada com a LC. O termo “extração em fase sólida” (*solid phase extraction*) foi criada em 1982 com os funcionários da empresa J.T. Baker. (20-22)

Os benefícios e vantagens da SPE que alavancou sua utilização em procedimentos analíticos, em substituição a LLE e a extração por soxhlet, foram o menor tempo de análise, redução do custo e do consumo de solventes orgânicos, diminuição da exposição do analista a solventes tóxicos e também o fato de não gerar emulsão e promover altos fatores de concentração. Adicionalmente, diferente de microtécnicas modernas de preparo de amostra (SPME e SBSE) no qual promovem a extração baseada por equilíbrio, a SPE promove a extração exaustiva dos analitos na amostra. Dependendo das características da matriz e da concentração dos analitos, a SPE pode ser utilizada para concentrar os compostos de interesse, isolar os analitos (*clean up*), isolar a matriz ou ainda, ser utilizada com estocagem dos analitos do campo de coleta até o laboratório de análise. (20)

2.1.1.1 Mecanismos de separação

Os mecanismos de separação utilizados em SPE são os mesmos utilizados na cromatografia líquida clássica, sendo que a escolha da fase extratora vai depender da natureza do analito de interesse e da matriz. Os mecanismos de separação mais empregados em SPE são adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho. Neste contexto, as interações entre os analitos e a fase extratora ocorrem por interações intermoleculares tais como as interações tipo London, eletrostática, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, íon-íon e ligação de hidrogênio. (22)

2.1.1.2 Formato

O formato mais popular e utilizado em SPE é a fase extratora empacotada em cartuchos ou seringas (Figura 2.1). Nesses dispositivos, polipropileno e polietileno são os materiais empregados como corpo e disco poroso (*frit*) dos cartuchos. Entretanto, o formato

Figura 2.1 – Formatos tipicamente empregados em SPE.

Fonte: Adaptado de (23).

(*design*) pode variar para promover a compatibilidade com sistemas automatizados. Além disso, o formato desses cartuchos apresenta variações de acordo com o fabricante. Tipicamente, o tamanho das partículas empregadas neste processo varia entre 40 – 60 µm e, a quantidade de fase extratora depende da aplicabilidade do método. A limitação deste formato está relacionada com a vazão restrita e, conseqüentemente, a aplicação de grande volume de amostra. Entretanto o uso de um dispositivo de múltipla extração possibilita preparar diversas amostras simultaneamente. (20, 21)

O disco é o segundo formato mais empregado em SPE. Neste formato, o sorvente é imobilizado numa rede de microfibras de membranas de vidro ou politetrafluoretileno (PTFE ou teflon) no qual possuem aproximadamente 0,5 µm de espessura. Discos de fibra de vidro são mais espessos e rígidos, proporcionando vazões mais elevadas durante a aplicação da amostra quando comparadas com discos baseados em PTFE. As partículas imobilizadas nas membranas são menores que as utilizadas em SPE com cartucho, variando entre 8 – 12 µm. O tempo gasto na percolação de grande volume de amostra em discos é menor quando comparada com cartuchos. Entretanto, o volume de *breakthrough* (volume de amostra que atravessa o sorvente até o momento em que os compostos absorvidos são liberados na extremidade oposta) é diminuído e os discos têm sido empregados em extrações no qual a interação entre a sorvente e o analito seja suficiente para promover sua retenção no disco. (20, 21)

Outro formato empregado é a bandeja ou placa de 96 poços (*96-well SPE plates*). Este formato permite o processamento de 96 amostras simultaneamente e, portanto, diminuindo o tempo gasto no preparo de amostra. Cada um dos 96 poços possui um cartucho contendo a

fase extratora particulada (3 – 10 mg) ou discos. Além disso, outros formatos têm sido empregados no processo de extração. Podemos destacar também a extração em ponteiros (*pipette tips*), e miniaturização da SPE, no qual podemos citar a SPME, SBSE e, mais recentemente, MEPS.

2.1.1.3 Modo de integração da extração em fase sólida

Em SPE, quatro diferentes modos de operação podem ser utilizados para integrar o preparo de amostra com o método de separação e detecção (Figura 2.2). (24, 25)

O modo mais empregado é o *off-line* (fora da linha) na qual todas as etapas são realizadas manualmente pelo analista. De maneira geral, a Figura 2.3 ilustra as etapas envolvidas na SPE *off-line*. O cartucho/seringa de extração é condicionado para a ativação do material extrator para que haja interação efetiva com os analitos de interesse através de pressão positiva ou negativa. Depois ocorre a aplicação da amostra pelo cartucho de extração. Nesta etapa é importante um controle da vazão para obter métodos reprodutíveis e também promover interação suficiente entre fase extratora e os analitos. Posteriormente, é realizada a etapa de remoção dos interferentes (*clean up* da amostra). Por fim, a eluição dos analitos do cartucho utilizando o menor volume possível de solvente, seguida da secagem do eluato

Figura 2.2 – Modos de integração entre o preparo de amostra e o sistema de separação e detecção.

Fonte: Adaptado de (25).

Figura 2.3 - Etapas envolvidas no processo SPE off-line. (1) Condicionamento do cartucho de extração, (2) Aplicação da amostra, (3) Remoção dos interferentes (clean up) e (4) eluição dos analitos.

empregando vazão de gás (nitrogênio, por exemplo) e a ressuspensão em solvente adequado seguida da análise cromatográfica. (19, 20)

Outro modo de operação é o *at-line* (na linha) na qual todas as etapas de tratamento da amostra do processo *off-line* são robotizadas e o extrato final dos analitos é injetado no LC. (26). Algumas opções no mercado de equipamentos operando neste modo são o ASPEC (Gilson), Microlab (Hamilton) e Rapid Trace (Zymark). (20)

O modo *in-line* (em linha diretamente) possui a coluna de extração em linha com a coluna analítica sem a presença de válvulas ou dispositivos entre as colunas. (27) As vantagens desse sistema é a automação do processo e a análise direta dos analitos sem gerar extratos. Em contrapartida, a análise de amostras complexas é dificultada devido ao entupimento da coluna ou adsorção de interferentes da matriz. Adicionalmente, devido a injeção direta da amostra na coluna, a eficiência na separação cromatográfica está fortemente relacionada com o volume da amostra e a natureza do solvente de eluição.

Já o modo *online* (em linha indiretamente) pode ser realizado de duas maneiras. A primeira é através de equipamentos automatizados que são capazes de realizar todas as operações do modo *off-line*, porém, diferentemente do modo *at-line*, não é gerado um extrato contendo os analitos, pois todo eluato do cartucho é transferido em linha para o sistema cromatográfico. Neste modo, assim como no *off-line* e *at-line*, costuma ser necessário um cartucho de extração para cada amostra a ser extraída. Prospekt da SparkHolland, OSP-2 da

Merck e ASPEC XL da Gilson são exemplos de equipamentos que realizam a integração *online* entre SPE-LC. Um aumento na produtividade é alcançado com esses equipamentos, pois enquanto a próxima amostra é automaticamente preparada, os analitos da extração anterior são analisados no sistema de separação/detecção. (20)

Outro modo de operação *online* utiliza o próprio cromatógrafo em um arranjo bidimensional (*column switching*), no qual a pré-coluna de extração está interligada à coluna analítica através de uma válvula de comutação. A vantagem do modo *online* de SPE por *column switching* é a automação do processo de extração sem a necessidade de equipamentos dedicados ao processo de extração. Nesse arranjo instrumental, a amostra é injetada diretamente pelo amostrador automático do LC, os interferentes são removidos, os analitos são eluídos após o giro da válvula de comutação, separados na coluna analítica, e posteriormente, detectados (Figura 2.4). Outro fator positivo é o enriquecimento da amostra, pois não há perda de analito durante a extração. Além disso, não há contaminação externa da amostra, ocorre a redução do tempo de análise, os resultados são mais reprodutíveis e a mesma coluna de extração pode ser utilizada diversas vezes. Como desvantagem, nesse sistema não há como repetir a injeção do mesmo extrato e a seleção do solvente de *clean up* e de eluição dos analitos se torna um pouco mais restrita. (28-30)

Figura 2.4 – Representação esquemática da técnica bidimensional por *column switching* aplicada em LC. Posição de carregamento da amostra (A) e posição de eluição da amostra (B)

Fonte: Adaptado de (31).

2.1.1.4 Fases extradoras

A seleção da fase extratora em SPE é um dos parâmetros mais importantes quando se trabalha com essa técnica, e a escolha deve ser feita com base na polaridade dos analitos e da amostra. Atualmente diversas fases extradoras têm sido utilizadas em SPE. Entre os sorventes clássicos, podemos destacar os materiais baseados em sílica (Figura 2.5). Sílica gel (SiO_2) pode ser utilizada como fase adsorvente sem modificação adicional. A superfície das partículas de sílica possuem grupos silanois que interagem com os analitos no processo de extração. Adicionalmente, alumina (Al_2O_3) e florisil (silicato de magnésio (Mg_2SiO_3)) também são fases extradoras muito empregadas na etapa de *clean up* no preparo de amostra em algumas aplicações tais como ácidos graxos e pesticidas clorados. Para aumentar o escopo de compostos a serem extraídos, foram desenvolvidas fases extradoras nas quais a superfície

Figura 2.5 – Estrutura de sorventes baseados em sílica.

Fase Reversa

Fase Normal

Troca Iônica

da sílica é modificada quimicamente com uma grande variedade de grupamentos orgânicos. A funcionalidade desses materiais pode ser classificada como sendo fase reversa, no qual se utiliza grupamentos não polares (C18, C8, C4, C2, ciclohexil, fenil); fase normal, no qual emprega grupamentos polares (amino, ciano, diol); troca iônica (SCX e SAX) e modo misto (não polar e trocador iônico). (19, 32)

Dentre as fases citadas, as mais utilizadas no processo de extração contem o grupamento C18 ou C8. Materiais baseados em sílica são estáveis em valores de pH entre 2 e 8. Abaixo do pH 2 ocorre a quebra da ligação com o grupo funcional e pH acima de 8 favorece a solubilização da sílica. Na tentativa de ampliar a faixa de pH no processo de extração utilizando esses materiais, algumas estratégias tem sido desenvolvidas. Materiais que passaram pelo processo de *endcapping* (segunda funcionalização com grupos menores que o C18) ou o uso de fases trifuncionais em substituição aos grupamentos monofuncionais são exemplos de fase extratora que possuem estabilidade com uma maior faixa de pH. Esse tipo de material apresenta bons resultados na extração de compostos apolares e com polaridades intermediárias, contudo, possuem baixa eficiência na extração de compostos com polaridade elevada. Para minimizar essa problemática, fases extradoras contendo C18 monofuncional e sem o processo de *endcapping* tem sido utilizadas para promover interações secundárias entre o analito e o silanol residual na superfície da sílica, contudo, a faixa de pH aplicável é restrita. (33)

A introdução de fases extradoras poliméricas possibilitou estender a faixa de pH (1 - 13) utilizada nos processos de extração. O polímero poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) é um exemplo de fase extratora polimérica (Figura 2.6). A extração de compostos polares foi parcialmente solucionada com o uso de PS-DVB pois a superfície do polímero possui grupos aromáticos que permite interações π - π com os analitos. (19)

Mais recentemente, foram desenvolvidas fases extradoras poliméricas funcionalizadas, no qual diferentes grupos funcionais hidrofílicos (acetil, benzoil, o-carboxibenxoil,

Figura 2.6 – Fase extratora polimérica apolar PS-DVB.

hidroximetil, sulfonato e trimetilamônio) foram inseridos na estrutura do polímero PS-DVB (Figura 2.7). (34, 35)

Adicionalmente, a preparação de materiais extratores por polimerização do divinilbenzeno (lipofílico) com *n*-vinilpirrolidona (hidrofílico) possibilitou o desenvolvimento de sorventes que tivessem características hidrofílica e lipofílica (*hydrophilic-lipophilic balanced*, HLB) em sua superfície (Figura 2.8). Esses materiais têm demonstrado bons resultados na extração de compostos polares e apolares. (20, 21)

Figura 2.7 – Esquema geral de modificação da fase polimérica PS-DVB.

Fonte: Retirado de (35).

Figura 2.8 – Estrutura polimérica da fase extratora Oasis HLB comercializada pela Waters.

Fases baseadas em carbono, tais como o carbono poroso grafitado (*porous graphitized carbon* - PGC) e os nanotubos de carbono (*carbon nanotube* – CNTs) também vêm sendo exploradas como fase extratora em SPE (Figura 2.9). (36, 37) PGC consiste em fitas entrelaçadas de carbono, em que cada fita é constituída por cerca de 30 camadas de folhas. Já

Figura 2.9 – Estrutura de fases baseadas em carbono. (A) carbono poroso grafitado, (B) nanotubos de carbono de parede simples (*single-walled carbon nanotube* – SWCNT) e (C) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotube* – MWCNT).

Fonte: Adaptado de (38, 39).

os CNTs são estruturas finitas de carbono com morfologia tubular em dimensões nanométricas e tem apresentado desempenho similar ou superior na extração de compostos quando comparada com fases extratoras baseadas em sílica e poliméricas.

Sorventes seletivos também tem sido desenvolvido para aumentar a qualidade do processo de extração dos analitos. Uma estratégia seletiva para promover a extração dos analitos e a eliminação das macromoléculas é o uso de fases extratoras modificadas superficialmente com meio de acesso restrito (RAM). Nesse modo de operação, os materiais apresentam características mistas no qual ocorre a combinação da cromatografia por exclusão e da cromatografia em fase reversa (Figural 2.10). (29, 40)

Em técnicas de imunoextração, a fase extratora possui anticorpos específicos para um grupo de compostos ligados quimicamente na superfície do sorvente (Figura 2.11). Assim, em uma única etapa, os analitos são seletivamente concentrados na coluna extratora. (41)

Outra abordagem de extração seletiva e baseada no reconhecimento molecular é o uso de polímeros molecularmente impressos (MIP). Esses materiais tem se destacado pela vantagem de serem mais seletivos para um composto ou uma classe de compostos em relação às fases tradicionais de SPE. (42-44) A Figura 2.12 apresenta o esquema geral sintético do preparo MIP. Na primeira etapa, há uma interação das moléculas precursoras do polímero com a molécula alvo (*template*) formando um complexo monômero-*template*. Essa interação leva a posições específicas das extremidades dos monômeros ao redor do *template*. A próxima

Figura 2.10 – Representação da fase extratora RAM.

Fonte: Adaptado de (22).

Figura 2.11 – Representação de fase extratora baseada em imunoafinidade.

Fonte: Adaptado de (22).

Figura 2.12 - Ilustração esquemática de preparo do MIP.

etapa é a reação de polimerização, na qual ocorre a formação do polímero ao redor do *template*. Nesta etapa ocorre a fixação dos grupamentos dos monômeros no material polimérico. Por fim, após a remoção do *template*, temos o MIP com cavidades e sítios

seletivos para a extração do *template* ou de estruturas análogas a ele. (45) Detalhes e maiores informações sobre este material encontram-se no Capítulo 4 da tese.

2.2 Técnicas de separação

Atualmente diversas técnicas têm sido utilizadas nas determinações analíticas. Podemos citar como exemplo as técnicas eletroanalíticas, a eletroforese capilar e a cromatografia. (46) Entre essas técnicas, a cromatografia vem se destacando nas análises qualitativa e quantitativa.

Cromatografia é o termo empregado para descrever a separação físico-química de componentes de uma amostra através das diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. (47)

Existem diversas classificações da cromatografia, contudo, de maneira geral, pode ser dividida, de acordo com a fase móvel utilizada, em cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC), cromatografia com fluido supercrítico (SFC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). (32)

A HRGC apresenta bons resultados de tempo de análise e eficiência cromatográfica contudo, como inconveniente, as amostras precisam ser voláteis e estáveis termicamente nas temperaturas de análise. Outro fator importante é a necessidade de derivatização dos fármacos quando os compostos possuem grupos $-OH$, $-NH_2$ ou $-COOH$ em suas estruturas.

A SFC é uma técnica que apresenta características da cromatografia líquida e gasosa. Apesar de ser uma técnica promissora, ela não foi muito empregada ao longo dos anos porém, atualmente, tem recebido uma atenção especial.

Já em HPLC, a restrição da técnica está relacionada com solubilidade dos analitos na fase móvel. Outra vantagem é a possibilidade de coleta da amostra após a análise quando não se utilizam detectores destrutivos. Assim, a HPLC, principalmente operando em fase reversa, é a técnica mais utilizada atualmente nas análises.

2.2.1 Desenvolvimento e evolução da cromatografia líquida

Carl Runge, um químico alemão nascido em 1856, relatou pela primeira vez a separação de corantes empregando uma técnica similar a cromatografia em papel. Entretanto o grupo de pesquisa não deu continuidade aos experimentos e as possíveis explicações dos

fenômenos envolvidos no processo. (33) No ano de 1897 David Talbot Day observou o fracionamento e alterações na composição do petróleo após a passagem por terra Fuller. Entretanto Day não conseguiu definir os processos envolvidos. (48) Em 1903, o botânico polonês Mikhael Semenovich Tswett apresentou trabalhos descrevendo a separação de pigmentos de folhas de plantas através da adsorção dos analitos em colunas de vidro preenchidas com diversos suportes sólidos e diferentes eluentes, sendo um dos seus experimentos, o carbonato de cálcio empregado como fase estacionária e éter de petróleo como a fase móvel. (49) Assim, historicamente, esse trabalho é relatado como sendo o marco inicial do desenvolvimento da técnica cromatográfica. O nome cromatografia intitulada por Tswett vem do grego no qual *chroma* e *graphe* significam cor e escrita, respectivamente.

A técnica cromatográfica foi pouco estudada até 1931 voltando a ganhar destaque quando Edgar Lederer apresentou experimentos identificando várias xantofilas presentes na gema do ovo. (50) Em 1941, Martin e Synge apresentaram um trabalho no qual descreveram o uso de cromatografia líquida por partição na separação de aminoácidos. Os autores aplicaram teorias cromatográficas e descreveram a possível aplicação de vapor como fase móvel, podendo ser considerado o início da cromatografia gasosa (GC). Além disso, sugeriram que a utilização de partículas menores operadas em altas pressões aumenta a eficiência de separação (primeiras citações de HPLC). (51) Esse, e outros trabalhos levaram ao reconhecimento da importante contribuição de ambos no desenvolvimento da cromatografia no qual em 1952 receberam o prêmio Nobel de Química.

A cromatografia gasosa desenvolveu-se mais rapidamente em relação a cromatografia líquida (LC) pois a instrumentação era mais simples e as teorias existentes não explicavam claramente o papel da fase móvel e estacionária em LC. (52) Isso conduziu ao grande avanço na cromatografia gasosa, visto que, em 1957 já havia colunas capilares (desenvolvidas por Golay) e equipamentos para GC, enquanto a cromatografia líquida ainda era conduzida quase que exclusivamente de acordo com os experimentos de Tswett, ou seja, em colunas de vidro (1 – 5 cm de diâmetro e 50 – 500 cm de comprimento) contendo fase estacionária (120 -200 μm) no qual a fase móvel era eluída apenas por gravidade ou com pequenas pressões de um gás inerte sobre o solvente. Esse procedimento era demorado, podendo levar dias para completar uma análise. No decorrer dos anos alguns trabalhos efetuando separações rápidas e eficientes utilizando cromatografia líquida foram realizados empregando moderadas pressões. (53)

Durante o aperfeiçoamento da cromatografia líquida percebeu-se que seria necessário desenvolver uma sofisticada instrumentação para operar em pressões elevadas com o objetivo

de aumentar a eficiência da separação (utilização de partículas menores). Assim, no decorrer da década de 1960 dois grupos de pesquisa (Csaba Horváth nos Estados Unidos e Josef Huber na Europa) conduziram estudos voltados para o desenvolvimento do sistema HPLC. (33) Juntamente com esse processo, ocorreu aprimoramento das técnicas de empacotamento de partículas. Assim, tecnologias para o empacotamento de colunas reproduzíveis com partículas abaixo de 30 μm foram desenvolvidas (fato que não havia sido obtido anteriormente). (54) No final da década de 1960 as empresas Waters e DuPont colocaram no mercado os primeiros equipamentos de HPLC. Alguns anos mais tarde, outras empresas entraram no ramo com equipamentos similares e como consequência, houve um grande avanço em pesquisas voltadas para HPLC. A Figura 2.13 ilustra o esquema geral de um equipamento de HPLC. As bombas dos equipamentos operavam em pressões de 200 – 340 bar (3000 – 5000 psi). Os sistemas de introdução de amostra eram por válvulas ou seringas e septos. A coluna era um tubo com parede grossa de vidro ou metal com diâmetro interno de 2 a 5 mm e 0,1 a 2 m de comprimento. Na saída da coluna cromatográfica, um detector capaz de gerar sinal analítico era empregado para monitorar a concentração dos analitos ao saírem da coluna. (33, 48)

No início da década de 1970, o primeiro livro voltado para a temática HPLC foi publicado pelos autores Snyder e Kirkland. Nesta publicação foi introduzido e discutido o tema “cromatografia líquida moderna”. (32)

Nesta época, diversas discussões e publicações consolidaram as fundamentações da LC e expandiram a aplicação em diferentes áreas. Nesse período, surgiram os nomes

Figura 2.13 – Esquema geral de um equipamento de HPLC. (A) bomba, (B) sistema de introdução de amostra, (C) forno cromatográfico, (D) coluna, (E) sistema de detecção, (F) descarte/coleta da amostra e (G) sistema de aquisição de dados.

“Cromatografia Líquida de Velocidade Rápida” (*High Speed Liquid Chromatography*, HSLC) e também “Cromatografia Líquida de Alta Pressão” (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC), sendo este último o termo mais empregado. Contudo, posteriormente, a sigla permaneceu a mesma e o nome foi alterado para a forma como conhecemos atualmente “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência” (*High Performance Liquid Chromatography*).

A alta resolução, eficiência, automação e menor tempo de análise, reprodutibilidade e reutilização da coluna são algumas das vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em relação a cromatografia líquida clássica. (48) Assim, de 1970 até os dias atuais, a HPLC foi sendo desenvolvida sempre buscando melhoria na eficiência cromatográfica aliada ao menor tempo de análise. A Figura 2.14 ilustra a evolução da análise por HPLC ao longo

Figura 2.14 – Representação cromatográfica que ilustra a evolução da HPLC ao longo dos anos.

Fonte: Adaptado de (33).

dos anos. O bom desempenho da HPLC está relacionado principalmente com a evolução do *design* dos sistemas cromatográficos aliado juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias colunas no qual são preenchidas com partículas cada vez menores permitindo a diminuição do comprimento da coluna. (55)

Os sistemas cromatográficos convencionais operam com pressões de até 400 bar. Nesses sistemas, colunas preenchidas com partículas na faixa de 3 – 10 μm têm sido utilizadas nas análises. A partir de 2004 foi introduzido no mercado equipamentos capazes de operar em pressões de até 1000 bar. O desenvolvimento de cromatógrafos de alta pressão possibilitou a utilização de colunas contendo partículas sub 2 μm . Assim, vazões mais elevadas são utilizados sem perder a eficiência da separação. Para análises empregando essas colunas, a denominação cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC), tem sido utilizada. Entretanto, a única mudança no equipamento não ficou restrita apenas a alta pressão suportada. Os equipamentos tiveram que reduzir o volume do sistema. Neste sentido, coluna, tubulações, sistema de introdução de amostra e de detecção tiveram que passar por adaptações. Assim, os sistemas de injeção tem que possuir um ciclo rápido de injeção; os detectores uma alta taxa de aquisição de dados e o gradiente da fase móvel deve ser efetivo para não prejudicar a separação cromatográfica. (56)

As colunas empregadas em HPLC possuem uma ampla faixa de diâmetro interno. Assim, pode-se classificar as colunas cromatográficas de acordo com o diâmetro interno e a vazão da fase móvel empregada (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Classificação da cromatografia líquida de acordo com o diâmetro interno das colunas e o intervalo de vazão da fase móvel.

Denominação da coluna	Diâmetro interno	Vazão típica
Preparativas	> 10 mm	> 20 mL min ⁻¹
Semipreparativas	4,6 – 10 mm	5 – 20 mL min ⁻¹
Convencional/padrão	4,0 – 4,6 mm	1 – 5 mL min ⁻¹
Narrowbore	2,0 – 4,0 mm	0,2 – 2 mL min ⁻¹
Microbore	1,0 – 2,0 mm	50 – 1000 μL min ⁻¹
Capilar	100 μm – 1 mm	0,5 – 200 μL min ⁻¹
Nanobore	25 - 100 μm	25 – 4000 nL min ⁻¹
Tubulares abertas	< 25 μm	< 25 nL min ⁻¹

Fonte: Retirado de (32).

Pode-se observar que a diminuição do diâmetro interno da coluna cromatográfica promove a redução da vazão da mesma. Esta redução de escala vem de acordo com o termo “Química Verde” no qual foi introduzido por Anastas (57, 58), e, nesse âmbito, posteriormente evoluiu a ideia da “Química Analítica Verde”. (59, 60)

A miniaturização da LC surgiu 10 anos após a introdução de colunas capilares para GC, com os trabalhos pioneiros de Horvath et al. Em 1967 (61, 62) Apesar do início promissor, a miniaturização da LC foi lenta ao longo dos anos devido à restrição de instrumentação adequada. Em LC capilar, as bombas devem produzir vazões baixas ($\mu\text{L min}^{-1}$) com pulsação minimizada; as tubulações do sistema cromatográfico devem contribuir pouco ao volume extra-coluna; e os sistemas de introdução de amostra e os detectores devem apresentar volumes compatíveis com as colunas capilares para evitar a dispersão da banda cromatográfica.

As principais vantagens do uso da cromatografia líquida miniaturizada estão relacionadas com a redução no diâmetro interno da coluna e, conseqüentemente, a diminuição do consumo de fase móvel e da quantidade de fase estacionária empregada. Essa situação é ambientalmente amigável e possibilita o uso de aditivos ou de fase móvel ou estacionária exótica possibilitando novas interações na busca de melhores resultados de seletividade. Outras vantagens são o menor consumo de amostra, principalmente quando a quantidade disponível é restrita; hifenação direta com diversos sistemas de detecção; e o aumento na sensibilidade com detectores sensíveis à concentração, devido à diminuição da diluição cromatográfica. (63, 64) Ainda pode-se destacar a melhor eficiência de ionização e a menor contaminação de fontes de ionização baseadas em *electrospray* (eletrovaporização), no acoplamento à espectrometria de massas, fato esse importante no caso de amostras complexas e que tendem, inclusive, a um maior efeito de matriz.

Nos últimos anos, equipamentos comerciais vêm sendo colocado no mercado com aplicabilidade em escala micro, capilar e nano com limites de pressões dos equipamentos convencionais (400 bar) e pressões elevadas (1000 bar). Contudo, alguns equipamentos utilizam a divisão de vazão para atingir as vazões exigidas na escala miniaturizada e, conseqüentemente, não apresentam a vantagem da redução do consumo da fase móvel.

2.2.2 Evolução dos suportes cromatográficos em LC

Na década de 1950 as partículas para LC eram de materiais porosos e com formato irregular com 100 - 200 μm de diâmetro (Figura 2.15A). Entretanto esses materiais ocasionavam alargamento das bandas cromatográficas e, conseqüentemente, uma diminuição da eficiência cromatográfica. Outro problema encontrado na época está relacionado com a dificuldade de empacotar as colunas. Assim, problemas de reprodutibilidade de análise era um desafio a ser superado. Esse problema foi solucionado na década de 1960 no qual Horváth desenvolveu partículas de sílica peliculares (30 – 50 μm) (Figura 2.15B). Esse material apresentou bons resultados utilizando o empacotamento a seco. O suporte cromatográfico era composto por um núcleo sólido, rígido e não poroso (contas de vidro), revestido com uma película de aproximadamente 1 μm de sílica porosa. A fina camada pelicular permitiu uma rápida transferência do analito na camada porosa do suporte cromatográfico e, assim, promoveu um melhoramento da eficiência cromatográfica comparada com as partículas porosas empregadas na época. Em contrapartida, os suportes peliculares possuem baixa área superficial e, conseqüentemente, uma diminuição na capacidade de amostra e também na retenção dos analitos. (33, 65)

Figura 2.15 – Formato dos suportes cromatográficos. (A) partículas porosas e irregulares, (B) partícula pelicular esférica, (C) partícula esférica porosa, (D) partícula esférica não porosa, (E) partícula superficialmente porosa e (F) monólito.

Fonte: Adaptado de (33)

A transição de partículas peliculares para partículas porosas menores iniciou na década de 1970 com o desenvolvimento da técnica de empacotamento por suspensão (*slurry packing method*) no qual permitiu obter colunas com micropartículas de sílica irregular e porosa com diâmetro médio de 10 μm . Com o passar do tempo, e o melhor entendimento/aperfeiçoamento dos métodos sintéticos, partículas esféricas porosas foram desenvolvidas (Figura 2.15C). A uniformidade das partículas forneciam melhores empacotamentos da coluna cromatográfica e consequentemente, colunas mais eficientes.

Na década de 1980 foram desenvolvidas partículas de 5 μm os quais apresentaram melhor desempenho que as partículas anteriores. Em seguida, no início da década de 1990 partículas de 3,5 e 3 μm possibilitaram diminuir em entre 30 - 50 % o tempo de análise sem perder a resolução na separação cromatográfica quando comparadas com partículas de 5 μm . (33, 56)

Partículas não porosas foram introduzidas em 1996 com diâmetro de aproximadamente 1,5 μm (Figura 2.15D). Esse suporte minimiza o efeito de difusão no poro e, portanto, podem ser aplicadas vazões elevadas sem perder a eficiência cromatográfica. Sílica não porosa também possui maior resistência mecânica e térmica. Entretanto, suporte não poroso possui baixa área superficial, menor retenção dos analitos e menor capacidade de amostra.

Em 2004, sílica porosa sub 2 μm foi disponibilizada comercialmente, apresentando melhor eficiência quando comparada com colunas de 3 μm . A grande vantagem desses materiais é utilizar vazão acima do valor considerado ótimo para a separação sem perder a resolução na separação cromatográfica. Outra vantagem é a possibilidade de redução do comprimento da coluna sem perder a eficiência da separação. Como resultado, colunas com partículas sub 2 μm possibilitaram alcançar análises cromatográficas em menos de 1 minuto. Como desvantagem, as pressões geradas pelo tamanho das partículas impossibilitam seu uso em equipamentos convencionais (400 bar). Assim, essas colunas necessitam de um equipamento com arranjo dedicado para operar em altas pressões (UHPLC). (33, 66)

Para evitar as altas pressões geradas utilizando partículas porosas sub 2 μm , em 2007 foram introduzidas no mercado as colunas com partículas superficialmente porosas (*core shell particles*) os quais podem ser utilizadas em sistemas convencionais e, adicionalmente, fornecerem análises rápidas (Figura 2.15E). As partículas possuem um núcleo sólido e não poroso, de aproximadamente 1,7 μm de diâmetro, e uma camada porosa revestida externamente de 0,5 μm de espessura. Esse material possui uma faixa estreita de distribuição

de partícula, apresenta eficiência cromatográfica elevada e uma rápida cinética de transferência de massa. (66)

Além dos materiais particulados, outra possibilidade de suportes cromatográficos envolve o uso de materiais monolíticos (Figura 2.15F). (67) Um material monolítico possui estrutura sólida e altamente porosa que fornece alta permeabilidade da fase móvel através dos canais porosos. Esses podem ser classificados como microporos (não excedem 2 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm) e macroporos (acima de 50 nm), dependendo do molde utilizado na síntese do monolito. (68) A principal vantagem das colunas monolíticas em relação a colunas com preenchimentos de materiais particulados é a redução do tempo de análise pois vazão elevada pode ser empregado sem um grande aumento na pressão do sistema. As primeiras colunas monolíticas disponíveis comercialmente (2000) não apresentavam alta eficiência na separação quando comparadas com colunas particuladas. Entretanto, recentemente (2012) foram desenvolvidas colunas monolíticas de segunda geração chamadas de colunas monolíticas de alta resolução os quais possuem um maior número de pratos por metro sem comprometer a vantagem da vazão elevada e pressões compatíveis com os sistemas convencionais de LC. (66) A Figura 2.16 ilustra a comparação de coluna particulada e monolítica.

De forma resumida, a Tabela 2.2 apresenta a evolução dos suportes cromatográficos, a redução no tamanho das partículas e o aumento na eficiência das colunas.

Figura 2.16 – Característica estrutural de uma coluna particulada (A) e monolítica (B).

Fonte: Adaptado de (69).

Tabela 2.2 –Diminuição do tamanho das partículas em LC.

Ano	Tamanho da partícula	Morfologia	Pratos/15 cm
1950s	100 - 200 μm	Irregular porosa	200
1967	50 μm	Pelicular esférica	1000
1970s	10 μm	Irregular porosa	6000
		Esférica porosa	
1985	5 μm	Esférica porosa	12000
1992	3 μm e 3,5 μm	Esférica porosa	22000
1996	1,5 μm	Esférica não porosa	30000
2000	-	Monolítica	15000
2000	2,5 μm	Esférica porosa	25000
2004	1,7 μm	Esférica porosa	35000
2007	1,6 e 2,6 μm	Superficialmente porosa	30000
2012	-	Monolítica	22500

Fonte: Adaptado de (56, 66).

2.2.3 Suporte cromatográfico em LC

Um bom suporte cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência deve possuir algumas características fundamentais: (70)

- Ser mecanicamente estável, ou seja, suportar altas pressões exigidas na HPLC;
- Possuir grande concentração de grupos ativos na superfície a fim de promover melhor desempenho cromatográfico;
- Ser inerte em relação aos compostos a serem analisados.

Em cromatografia líquida os suportes cromatográficos podem ser baseados em polímeros inorgânicos ou orgânicos. (71) Entre os polímeros inorgânicos, podemos citar os óxidos de silício (sílica) que são os mais utilizados nas separações cromatográficas atuais. (72) A sílica apresenta-se em unidades tetraédricas (SiO_4) aleatórias unidas por grupos siloxanos e sua superfície apresenta grupos silanois. (65, 73)

As características do suporte cromatográfico baseado em sílica são extremamente dependentes da estratégia utilizada para o seu preparo. Entre as metodologias de síntese de sílica podemos destacar o método de gelificação das soluções de sal de silicato (sil-gel), o

método de hidrólise de organossilanos (sol-gel) e o método de agregação controlada de sílica coloidal estável. O termo sol é utilizado para definir uma dispersão de partículas coloidais (diâmetro entre 1 – 100 nm) enquanto o termo gel é caracterizado como um sistema formado por estruturas rígidas das partículas coloidais ou de cadeias poliméricas que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. (74)

Pela rota sílica gel (também chamada de sil-gel) utiliza-se o silicato de sódio como material de partida. A descoberta da sílica gel foi realizada por Thomas Graham (1981) o qual preparou a sílica a partir de uma mistura de uma solução aquosa de silicato de sódio com ácido clorídrico. Já o preparo do silicato de sódio normalmente é realizado através do aquecimento de areia e soda cáustica em temperatura elevada. (65)

Inicialmente a solução contendo o silicato de sódio sofre um processo de hidrólise com a adição do ácido clorídrico formando o ácido silícico. Posteriormente, ocorre a reação de condensação do ácido silícico formando dímeros, trímeros e consequentemente uma rede polimérica de ácido silícico (Figura 2.17).

A rede polimérica continua crescendo, e formando partículas esféricas primárias de alguns Angstroms de diâmetro (Figura 2.18A). As partículas primárias continuam a aumentar de tamanho (Figura 2.18B) e, posteriormente, sofrem condensação através dos grupos silanois presentes em sua superfície. Como resultado, as partículas primárias ficam aderidas umas as outras (aglomeração) e a solução começa o processo de gelificação para formar o hidrogel (Figura 2.18C).

Após a formação do hidrogel, o material sintetizado é submetido a um período de envelhecimento no qual as partículas primárias de sílica continuam o processo de polimerização. Esta etapa é importante, pois confere resistência mecânica ao material final. Em seguida o hidrogel passa pela etapa de desidratação (secagem) na qual é transformado em xerogel. (65)

A característica final da sílica sintetizada é extremamente dependente das condições reacionais (concentração dos reagentes, temperatura da reação, pH da solução, tempo e condições de envelhecimento e processo de secagem) e muitas vezes difícil de controlar e reproduzir. A influência do pH no tempo de gelificação está representada na Figura 2.19. Pode-se observar que em baixos valores de pH, o tempo de gelificação aumenta rapidamente com o aumento do pH (próximo a 2). Na faixa de pH entre 2 e 4, a solução é estável e muitas horas são necessárias para promover a formação do hidrogel. Em contrapartida, se o pH da solução é ajustado entre 4 e 8, a solução se torna instável e a formação do hidrogel ocorre em

Figura 2.17 – Etapas do processo sil-gel: hidrólise e condensação.**Hidrólise** **Condensação** **Figura 2.18** – Representação da formação da sílica gel. (A) formação das partículas primárias, (B) aumento de tamanho das partículas primárias e (C) formação do hidrogel.

Fonte: Adaptado de (65).

Figura 2.19 – Influência do pH no tempo de gelificação no processo sil-gel.

Fonte: Adaptado de (65).

poucos minutos. Acima de pH 8 o tempo de gelificação começa a aumentar novamente e ocorre a competição com a quebra da rede polimérica da sílica devido sua solubilização. (65)

Partículas de sílica formadas na faixa de pH entre 1 – 4 apresentam grande área superficial (aproximadamente $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Em contrapartida, a medida que o pH é aumentado de 4 para 8 ocorre uma diminuição dos valores de área superficial ($800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). De forma geral, a área superficial das partículas de sílica é inversamente proporcional as dimensões das partículas primárias provenientes da polimerização do ácido silícico. Como resultado, as partículas primárias são relativamente menores quando preparadas em pH entre 1 – 4 quando comparadas com a faixa de 4 - 8.

Quando a solução de silicato de sódio com o pH ajustado é submetida a agitação magnética ocorre o fenômeno chamado maturação de Ostwald (também conhecido como envelhecimento de Ostwald). Esse processo consiste no aumento do diâmetro de partículas primárias a custa de partículas primárias com diâmetro menor (Figura 2.20). Adicionalmente o processo de maturação/envelhecimento do gel formado leva ao aumento do tamanho das partículas primárias. Além disso, logo após a formação do gel, o mesmo não apresenta rigidez e durante o processo de maturação por alguns dias, reações de condensação das partículas primárias continuam ocorrendo e o hidrogel se torna firme e com resistência mecânica. (65)

O processo de lavagem do hidrogel após o envelhecimento também altera as características finais da sílica. Estudos demonstram que a lavagem do hidrogel com solução ácida (pH =3) promove uma diminuição da área superficial do polímero quando comparada

Figura 2.20 – Processo de maturação de Ostwald.

com a lavagem com água em $\text{pH} = 6,5$. Além disso, a imersão do hidrogel em diferentes solventes também promove alterações no material sintetizado. Após todas essas etapas, o hidrogel é submetido ao aquecimento para se transformar em xerogel. Para serem utilizadas como suporte cromatográfico em LC, as partículas do xerogel são trituradas e separadas em faixas de diâmetros de partículas com aplicabilidade em LC. Ajustes nas condições sintéticas devem ser realizadas de acordo com os parâmetros desejados para o polímero final.

Esse método permite obter-se partículas irregulares sendo classificadas como sílica gel tipo A por utilizar precursor de baixa pureza e, portanto, apresentar maior quantidade de metais. (75, 76)

O processo sol-gel é uma segunda abordagem empregada para preparar partículas de sílica. Nesta rota sintética geralmente utiliza-se precursores alcoxissilano (tetrametoxissilano (MTOS) ou tetraetoxissilano (TEOS)) dissolvidos em álcool. Posteriormente, com a adição de água e catalisador (ácido ou básico) ocorre a reação de hidrólise e condensação. É importante ressaltar que a hidrólise dos alcoxissilanos ocorre com maior eficiência e rapidez quando catalisadores são utilizados no processo. Geralmente as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, assim que os reagentes são misturados. A reação de hidrólise leva a formação de grupos silanois e as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano. A Figura 2.21 ilustra as reações químicas que ocorrem durante a transformação sol-gel. A reação de condensação possui um mecanismo complexo, pois se inicia antes do término da reação de hidrólise.

No processo sol-gel a sílica obtida é classificada com sendo do tipo B por apresentar maior pureza em relação à sílica tipo A. As características finais da sílica são dependentes das condições experimentais de síntese (concentração dos precursores, a agitação, temperatura reacional, natureza do catalisador). Um método amplamente conhecido para a obtenção de

Figura 2.21 – Etapa de hidrólise e condensação no processo sol-gel.

Fonte: Adaptado de (77).

partículas esféricas e monodispersas de sílica é o método de Stober no qual se baseia na hidrólise e condensação de alcoxissilano em uma solução contendo água, álcool e amônia formando partículas de hidrogel que posteriormente são calcinadas para aumentar a estabilidade do material. (78) Normalmente as partículas obtidas neste processo são consideradas não porosas e possuem diâmetros em escala nanométrica. O aumento no diâmetro das partículas pode ser obtido através do método conhecido como crescimento de partícula semente o qual consiste em adições do precursor da sílica na suspensão coloidal das partículas.

Segundo Chang as partículas de sílica começam a aumentar de tamanho quando a concentração de TEOS no sistema alcança o nível saturado (C_s). Entretanto, se a concentração de TEOS ultrapassar um valor limite de saturação (C_s^*) ocorrem novas nucleações comprometendo a monodispersão das partículas (Figura 2.22). (79)

Já Chou avaliou o crescimento de partícula em relação a velocidade de geração de novas partículas e a velocidade de consumo do TEOS no crescimento de partículas. Se a velocidade de consumo do TEOS for maior que a de formação de novas partículas ocorrerá o crescimento da partícula sem o surgimento de partículas secundárias. Contudo, se o inverso ocorrer, aparecerão novas nucleações (Figura 2.23). (80)

Figura 2.22 – Representação da dispersão das partículas no experimento de aumento do diâmetro. (A) crescimento monodisperso e (B) crescimento com formação de partículas secundárias.

Fonte: Adaptado de (79).

Figura 2.23 – Esquema da geração e consumo do intermediário sintético no processo de crescimento de partícula.

Fonte: Adaptado de (80).

Uma forma de obter partículas porosas através do método de Stober é incorporando no processo sintético compostos formadores de poros. Nesse procedimento, moléculas volumosas são utilizadas como *template* de poros e incorporadas na rede polimérica de sílica. Assim, após sua remoção por calcinação, a partícula de sílica apresenta maior porosidade. Unger *et al* realizou trabalhos empregando alquilaminas (dodecilamina e hexadecilamina) para produzir poros nas partículas de sílica sintetizadas pelo método de Stober modificado. (81) Similarmente, outros trabalhos têm demonstrado bons resultados ao utilizar cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTAC) como surfactante porogênico. (82) Após a síntese do material, o mesmo é submetido a calcinação (500 – 600°C) para remoção da cadeia orgânica e geração dos poros na partícula de sílica. Com esse procedimento, materiais com mesoporos são tipicamente sintetizados. Adicionalmente, trabalhos têm relatado que o tamanho dos poros pode ser expandido para a faixa de meso e macroporos através do tratamento das partículas de sílica com hidróxido de sódio, carbonato de sódio ou agentes complexantes orgânicos em temperatura elevada. Pode-se considerar que este processo de adequação dos poros está relacionada e fundamentada no processo de maturação de Ostwald. (83, 84)

Uma terceira abordagem para a preparação de partículas de sílica porosa para LC é o método de agregação controlada. Nesta rota sintética, pode ser utilizada a agregação reativa ou agregação de gotículas (gotas) dispersas. A primeira foi desenvolvida por Iler e McQueston em 1977, os quais deram ao processo o nome de coacervação (*coacervation*). Nesse procedimento, uma solução aquosa e estável de partículas de sílica coloidal (centenas de Angstroms) é misturada com monômeros orgânicos miscíveis na solução. Após o processo de polimerização dos monômeros, as partículas coloidais de sílica são microencapsuladas em agregados esféricos na matriz polimérica orgânica. Por exemplo, ureia e formaldeído podem ser adicionados a uma solução coloidal em que, após ajuste do pH em faixas ácidas, ocorre o encapsulamento das partículas de sílica na escala nanométrica para a formação de partículas na escala micrométrica com polímero orgânico. Posteriormente, o polímero formado é tratado termicamente à temperatura de 500°C para remoção do polímero orgânico. Adicionalmente, a temperatura é elevada até 1000°C para a sinterização das micropartículas e aumento da resistência mecânica. (83) A Figura 2.24 ilustra partículas de sílica esféricas obtidas através deste procedimento experimental.

O método de agregação de gotículas (gotas) dispersas inclui o método de secagem por nebulização (*spray drying*) e o método de emulsão. O *spray drying* consiste na dispersão de uma suspensão coloidal de sílica através de um bocal formando pequenas gotículas do líquido

Figura 2.24 – Microscopia de partículas de sílica obtidas pelo método de microencapsulação.

Fonte: Adaptado de (85).

(Figura 2.25). A pulverização da suspensão ocorre dentro de um forno com temperatura em torno de 400°C. Essa etapa resulta na evaporação da água das gotículas empregando um gás

Figura 2.25 – Método de secagem por nebulização. (A) representação esquemática do equipamento de *spray drying* e (B) processo de nebulização e secagem da suspensão coloidal.

Fonte: Adaptado de (86, 87).

de secagem quente e na policondensação simultânea dentro das gotículas. As partículas obtidas após esse processo podem ser submetidas a um tratamento hidrotérmico para ajuste de porosidade. Tipicamente, a maioria das partículas sintetizadas por este procedimento é esférica, contudo há uma dependência da morfologia com as condições experimentais ajustadas. O tamanho das partículas produzidas varia de acordo com a concentração dos reagentes, temperatura do forno de secagem, abertura do bocal de pulverização, tamanho das gotículas e outros parâmetros. Os materiais obtidos por essa metodologia geralmente apresentam grande faixa de distribuição de partículas e necessitam de classificação para obter faixas estreitas de diâmetro de partícula para uso em LC. (71, 83)

Partículas esféricas porosas também podem ser obtidas através do método de emulsificação de uma suspensão coloidal, organossilano ou solução de silicato em solvente apolar no qual gotículas são formadas e em seguida são solidificadas formando as partículas esféricas que são separadas do meio reacional e submetidas a um tratamento térmico. É importante ressaltar, no entanto, que a distribuição do tamanho de partícula pode ser bastante ampla dependendo das condições de emulsificação utilizada para regular o tamanho das gotas. (71, 83)

Os suportes baseados em sílica apresentam faixa de pH aplicável limitado (2 - 8) e análise em temperatura superior a 60°C favorecem a solubilização da sílica. Assim, outros materiais foram desenvolvidos com o objetivo de ampliar a faixa de pH e temperatura nas aplicações. Desta forma, foi desenvolvido um suporte cromatográfico no qual a superfície da sílica foi recoberta com uma camada de grupamentos hidreto (-Si-H). Esse grupos foram formados pela reação dos silanois na superfície da sílica com o produto de hidrólise do precursor trietoxissilano (TES). Assim, os grupos polares presentes na superfície da sílica reagem formando uma superfície não polar, e, as interações indesejáveis dos analitos com os silanois residuais são minimizadas. Esses novos materiais são chamados de sílica tipo C, caracterizados por serem materiais híbridos e com alta pureza e com maior estabilidade química (Figura 2.26A). Nesta mesma linha, outros materiais híbridos foram desenvolvidos utilizando precursores que continham a ligação silício-carbono (Si-C). Assim, essa ligação faz parte do suporte cromatográfico e melhora a estabilidade dos materiais em uma faixa mais ampla de pH. A reação de TEOS com metiltrietoxissilano leva a incorporação do grupo metil na rede polimérica da sílica (Figura 2.26B). Um segundo exemplo de materiais híbridos é a reação de TEOS com bis(trietoxissiletano) formando suportes que contem ligações de etano na estrutura do polímero (Figura 2.26C). Adicionalmente, outra metodologia utiliza a

Figura 2.26 – Representação do preparo de sílica híbrida. (A) sílica híbrida com grupamento hidreto na superfície, (B) sílica híbrida com ligações silício-metil, (C) sílica híbrida com ligações de etano e (D) sílica híbrida com um organossilano na superfície.

modificação da superfície da partícula de sílica com um organossilano para ampliar a faixa de pH utilizado sem perder a estabilidade mecânica do material (Figura 2.26D). (33, 88, 89) Além disso, a inserção de um grupo organossilano (aminopropiltrietoxissilano ou viniltrimetoxissilano) é interessante ao considerar que a presença desses grupos funcionais facilita a reação química com outros grupamentos orgânicos. Este fator torna possível o desenvolvimento de novas fases estacionárias.

Em LC os suportes cromatográficos também podem ser obtidos a partir de óxidos metálicos, destacados pela estabilidade química e térmica. Os materiais baseados em óxido de alumínio (alumina - Al_2O_3) apresentam uma boa estabilidade em uma faixa mais ampla de pH (1 – 13). Entretanto, esse suporte cromatográfico apresenta uma eficiência cromatográfica inferior aos materiais baseados em sílica e, conseqüentemente, esse fator contribuiu para a utilização moderada desse suporte. (90, 91) Suportes cromatográficos baseados em óxido de zircônio (zircônia, ZrO_2) (92) e óxido de titânio (titânia, TiO_2) (93, 94) apresentam boa estabilidade em pH entre 1 e 14, e em temperaturas de até 200°C. A superfície desses materiais apresentam sítios ácidos de Lewis. Conseqüentemente, fases estacionárias baseadas nesses óxidos tem demonstrado modo misto de retenção (fase reversa e troca iônica, por exemplo). Além disso, analitos com características básicas podem interagir fortemente com esses sítios ácidos provocando caudas cromatográficas. (83) Outros óxidos metálicos também vêm sendo explorados como suportes cromatográficos. Podemos destacar os materiais baseados em óxido de cério (céria, CeO_2) (95) e óxido de tório (tória, ThO_2). Apesar das vantagens de estabilidade química e térmica, os suportes cromatográficos baseados em óxidos metálicos apresentam como desvantagem a dificuldade de síntese e funcionalização de partículas com propriedades adequadas para LC quando comparadas com materiais baseados em sílica. (88, 96, 97) Assim, trabalhos foram conduzidos na preparação de óxidos mistos no qual combinam as propriedades da sílica e dos óxidos metálicos. Neste conceito, os materiais mistos apresentam área superficial e diâmetro de poros adequados, melhores desempenhos em temperaturas elevadas e operação em uma faixa mais ampla de pH. (98)

Partículas esféricas porosas baseadas em polímeros orgânicos também são utilizadas como suporte cromatográfico em LC. Podemos citar o uso de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) em cromatografia líquida em fase reversa, troca iônica e exclusão por tamanho. Outros polímeros como metacrilato substituídos, alcoóis polivinílicos e poliacrilamida também tem sido usados. Apesar de possuírem uma ampla faixa de pH aplicável, esses materiais possuem baixa eficiência cromatográfica. (99) Adicionalmente, a facilidade de

encolhimento e expansão do polímero diminuem sua resistência mecânica e, como consequência, ocorre uma limitação na pressão máxima de análise. (32)

Suportes baseados em carbono grafitado poroso (PGC) consistem em partículas esféricas de carbono totalmente poroso formadas a partir de folhas planas de átomos de carbono dispostos em forma hexagonal. PGC são estáveis a um pH entre 1 – 14 e em temperaturas de até 200°C. No entanto, as partículas desse material não possuem resistência mecânica elevada e, conseqüentemente, apresentam uma limitação em termos de pressão máxima. (33)

Como já citado anteriormente, colunas monolíticas são utilizadas como suporte cromatográfico em LC. De acordo com a metodologia utilizada no preparo de colunas monolíticas, pode-se classificá-las em colunas monolíticas baseadas em polímeros orgânicos (100, 101) e colunas monolíticas baseada em sílica (obtida pelo processo sol-gel). (102, 103)

2.2.4 Fases estacionárias

A fase estacionária é que determina a retenção e a seletividade dos analitos na análise cromatográfica. Os grupos silanois na superfície da sílica apresentam polaridade e suas ligações de hidrogênio têm a capacidade de interagir com diversas moléculas, tornando possível a separação de substâncias (Figura 2.27).

Devido as primeiras separações cromatográficas terem sido realizadas utilizando a sílica (que possui superfície polar) como suporte cromatográfico, a cromatografia líquida em fase normal (*normal phase*, NP) é caracterizada por apresentar fase estacionária mais polar em relação à fase móvel; quando a fase estacionária for menos polar do que a fase móvel é denominada de cromatografia líquida em fase reversa (*reverse phase*, RP).(47)

Em HPLC as fases estacionárias podem ser classificadas em sorvidas, imobilizadas ou quimicamente ligadas. A primeira caracteriza-se por ser um líquido de baixa massa molar apenas sorvido na superfície do suporte cromatográfico, porém, essas fases estacionárias são difíceis de serem mantidas quando submetidas às pressões utilizadas na HPLC. Assim, é necessário empregar fases móveis saturadas com a fase estacionária e fazer um controle de temperatura e vazão para diminuir a remoção da fase estacionária e garantir um resultado confiável nas análises. (104)

Figura 2.27 – Grupos silanois presente na superfície da sílica.

Fonte: Adaptado de (33).

Outra metodologia utilizada para modificar a superfície de um suporte cromatográfico é o recobrimento com polímeros orgânicos. (105) Primeiramente o polímero é sorvido no suporte cromatográfico e, posteriormente, é imobilizado por reações de entrecruzamento catalisadas por agente químico (106) ou por processos físicos (radiação térmica, gama ou micro-ondas). (107) Essa técnica tem a vantagem de preparar fases estacionárias estáveis, além de isolar os sítios ativos residuais dos suportes cromatográficos. Entre os polímeros utilizados como fases estacionárias destacam-se o polietileno, poliestireno e os polissiloxanos. A maior dificuldade nessa técnica é a obtenção de um filme fino e homogêneo. (108)

A grande concentração de grupos silanois na superfície da sílica possibilita a modificação química obtendo as chamadas fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL) que possuem propriedades específicas relacionadas aos grupos ligados na superfície da sílica. (Figura 2.28). A síntese dessas fases teve início na década de 1960 através da reação de esterificação dos grupos silanois com um álcool alifático de cadeia longa (Figura 2.28A). Contudo a ligação Si-O-C é relativamente fraca em soluções aquosas, sendo hidrolisada rapidamente regenerando os grupos silanois na sílica. (54, 65, 109)

Figura 2.28 – Obtenção de fase estacionária quimicamente ligada. (A) reação de esterificação, (B) reação com SOCl_2 , (C) reação de organossilanização com reagente monofuncional, (D) reação de organossilanização com reagente difuncional e (E) reação do hidreto com grupo alquílico.

Na tentativa de obter FEQL estáveis foram preparados materiais a partir da reação da sílica com cloreto de tionila (SOCl_2) e posteriormente com reagente de Grignard gerando ligações Si-C, ou com aminas gerando ligações Si-N (Figura 2.28B). Apesar de serem ligações mais estáveis, comparando com a ligação Si-O-C, a ligação Si-N ainda apresenta faixa de pH restrita (4 a 8) e as fases obtidas por Grignard apresentam interferentes proveniente da rota sintética. A metodologia mais empregada atualmente no preparo de FEQL é a reação de organossilanização que utiliza modificadores do tipo cloro (Cl) ou alcoxissilano podendo ser mono, di ou trifuncional (Figura 2.28C e D). (65) Adicionalmente temos também a sílica tipo C na qual um grupamento alquílico pode ser ligado quimicamente na superfície do suporte cromatográfico através da reação dos grupamentos hidretos (Si-H) com

grupos alquílicos terminalmente insaturados, em presença de um catalisador (Figura 2.28E).

Quando um reagente funcionalizante silano monofuncional (clorodimetiloctadecilssilano (ODS) por exemplo) reage com o grupo silanol na superfície da sílica ocorre a formação da fase estacionária C18 monomérica (Figura 2.29). Fases obtidas por este procedimento são reprodutíveis e apresentam boa eficiência cromatográfica devido a rápida difusão do analito na camada da fase monomérica. Entretanto as fases monoméricas apresentam grande quantidade de silanol residual após o processo de funcionalização. Esses grupos silanois podem promover interações secundárias com os analitos e provocar alargamento da banda cromatográfica. Além disso, o uso dessa fase em pH baixo leva a hidrólise do grupo funcionalizador e consequentemente a perda de seletividade da coluna cromatográfica. Uma maneira de minimizar esses efeitos é promover uma segunda etapa de funcionalização com um reagente silano de volume menor (trimetilclorossilano (TMS)). Este procedimento diminui 20 – 30 % dos silanois residuais nas partículas de sílica. Assim, é importante ressaltar que a interação silanol-analito é minimizada e não completamente eliminada. (33)

Figura 2.29 – Representação de algumas fases estacionárias quimicamente ligadas no suporte cromatográfica baseado em sílica.

Fonte: Adaptado de (33).

Outra estratégia para bloquear os grupos silanois da sílica é utilizar reagentes funcionalizantes com proteção estérica. Esses precursores são uma variação das fases monoméricas pois os grupos metila ligados ao átomo de silício são substituídos por grupos volumosos (i-propil ou i-butil). Esses grupamentos dificultam o processo de hidrólise da fase estacionária e, portanto, são mais apropriados para análise em pH baixo. Entretanto, as fases com proteção estérica possuem menor concentração dos ligantes na superfície do suporte cromatográfico e consequentemente apresentam menor retenção quando comparadas com fases estacionárias monoméricas contendo o grupamento dimetil. Fases estacionárias bidentadas apresentam maior estabilidade em meio básico e, portanto são utilizadas para aplicações no qual é necessário um pH acima de 8.

Se um reagente silano bi ou trifuncional é empregado, dependendo das condições utilizadas, pode-se obter fases estacionárias com polimerização vertical ou horizontal. Essas fases tendem a ser mais estáveis do que fases monoméricas em pH baixo e alto. Entretanto, esses materiais possuem menor reprodutibilidade de retenção e seletividade devido a dificuldade de controlar o processo de polimerização do organossilano. Adicionalmente, as colunas contendo as fases poliméricas possuem uma menor eficiência na separação, principalmente quando vazão elevada é empregada. (33)

Atualmente diversas colunas com diferentes fases estacionárias estão disponíveis para HPLC (Figura 2.30) atuando no modo normal (diol, ciano, amino, SiO₂), reverso (C30, C18, C8, C4, C2, fenil, ciclohexil, fluoradas, grupos polares embutidos), iônico (SAX, SCX, WAX, WCX) ou seletivo (quiral, bioafinidade) e HILIC (cromatografia de interação hidrofílica). (54, 110)

2.3 Parâmetros cromatográficos em HPLC

Os parâmetros cromatográficos são uma ferramenta importante para avaliar e caracterizar cromatograficamente uma coluna de HPLC. Adicionalmente, antes de realizar a validação da metodologia, é fundamental averiguar se as condições estabelecidas na análise cromatográfica são capazes de gerar dados confiáveis. Assim, é importante verificar se os parâmetros cromatográficos estão de acordo com os limites recomendados e aceitos.

Os parâmetros cromatográficos são obtidos através de dados do cromatograma conforme apresentado na Figura 2.31. O tempo morto (t_m) é o tempo gasto para o analito percorrer toda a tubulação e chegar ao detector sem interagir com a coluna cromatográfica. Já

Figura 2.30 - Representação de fases estacionárias utilizadas em HPLC

Fonte: Adaptado de (33).

Figura 2.31 - Cromatograma ilustrativo de parâmetros cromatográficos de uma análise.

Fonte: Adaptado de (32).

o tempo de retenção (t_R) é o tempo decorrido desde a injeção cromatográfica até o máximo de altura do sinal. (32)

A velocidade linear da fase móvel (u) é comumente expressada em mm s^{-1} ou cm s^{-1} e pode ser calculada a partir do quociente entre o comprimento da coluna com o tempo de eluição de um composto não retido (t_m) como representado na Equação 1.

$$u = \frac{L}{t_m} \quad (1)$$

O fator de retenção (k) estabelece a relação entre o tempo em que um composto passa na fase estacionária e na fase móvel (Equação 2).

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad \text{Equação 2}$$

O número de pratos (N) expressa a eficiência de uma coluna cromatográfica e é calculado de acordo com a Equação 3.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{Equação 3}$$

Uma das formas de comparar a eficiência de colunas com diferentes comprimentos (L) e diâmetros de partículas (dp) é através do cálculo da altura equivalente a um prato (H) e altura reduzida do prato (h) (Equações 4 e 5).

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 4}$$

$$h = \frac{H}{dp} \quad \text{Equação 5}$$

A eficiência cromatográfica pode ser expressa numericamente através da determinação do número de pratos (N) ou da altura do prato (H). Sua relação com a velocidade linear média (u) da fase móvel é dada através da equação de van Deemter (Equação 6).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{Equação 6}$$

onde A é o termo para a difusão turbulenta (múltiplos caminhos), B é o termo para a difusão molecular, C é o termo de transferência de massa e u é a velocidade linear média da fase móvel.

A equação de van Deemter foi inicialmente desenvolvida para GC no qual a transferência de massa em gases é relativamente rápida. Em LC, os termos que envolvem a difusão na fase móvel e transferência de massa são mais pronunciados. Como consequência, ajustes na equação de van Deemter são necessários. Vários estudos foram conduzidos e publicados promovendo as modificações na equação de van Deemter, podem-se destacar as equações de Giddings, Huber e Knox. (32, 54) Como resultado desses estudos, o termo C, relacionado a transferência de massa, é melhor representado realizando a subdivisão em duas contribuições como representado na Equação 7.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u$$

$$A = 2\lambda dp \quad B = 2\gamma D_m \quad \text{Equação 7}$$

$$C_s = \frac{f_s(k)d_f^2}{D_s} \quad C_m = \frac{f_m(k)dp^2}{D_m}$$

O termo A é relacionado ao efeito dos múltiplos caminhos que o analito pode percorrer através do leito cromatográfico. Conforme mostrado na Equação 7, este termo é diretamente proporcional à qualidade do empacotamento (λ) e ao tamanho das partículas (dp). Este termo pode ser minimizado ao se preparar colunas com bom empacotamento e com partículas uniformes. O termo B da equação está relacionado à difusão longitudinal do analito na fase móvel. γ é uma constante relacionada ao empacotamento da coluna e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase móvel. Ao se utilizar vazões elevadas esse termo é minimizado. Os termos C_s e C_m são relacionados a transferência de massa do analito na fase móvel e na fase estacionária respectivamente sendo $f_s(k)$ e $f_m(k)$ funções complexas do fator de retenção k ; d_f a espessura da fase estacionária; dp o diâmetro da partícula; e D_s e D_m o coeficiente de

difusão do analito na fase estacionária e na fase móvel.

A Figura 2.32 ilustra o gráfico da variação de H em função da velocidade linear média. Adicionalmente, estão representadas de forma genérica as contribuições de cada termo no valor de H . De maneira geral, o vazão ótima para a coluna cromatográfica é obtida pela curva deste gráfico no qual é gerado o menor H e, conseqüentemente, uma melhor eficiência cromatográfica.

O fator de separação (α) expressa a separação entre dois analitos e é calculada pela relação existente entre o fator de retenção de acordo com a Equação 8.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Equação 8}$$

A resolução (R_s) é a medida da separação entre dois compostos e é obtida através da distancia entre os dois picos cromatográficos e suas respectivas larguras de base (Equação 9).

$$R_s = \frac{2\Delta t_{R(1,2)}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{Equação 9}$$

Figura 2.32 - Gráfico representativo da curva de van Deemter.

Outro modo de se avaliar a resolução é utilizando a equação mestra da resolução. Esta equação leva em consideração diversos parâmetros tais como, o número de pratos, fator de retenção e fator de separação, e é expressa pela Equação 10.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{k}{k+1} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \quad \text{Equação 10}$$

A representação gráfica da contribuição de cada um desses parâmetros na resolução é exemplificada na Figura 2.33. Pode-se observar que o fator de separação é o parâmetro que possui maior influência na resolução cromatográfica.

Distorções frontais e caudas nos picos cromatográficos podem ser avaliados através do fator de assimetria (A_s) calculado a 10% da altura do pico ou pelo fator de alargamento (TF) geralmente calculado a 5% da altura do mesmo. As Equações 11 e 12 e a Figura 2.34 apresentam a forma esquemática do cálculo desses parâmetros.

$$A_s = \frac{B}{A} \quad \text{Equação 11}$$

$$TF = \frac{A+B}{2A} \quad \text{Equação 12}$$

Figura 2.33 – Influência do fator de retenção, fator de separação e número de pratos sobre a resolução cromatográfica.

Fonte: Adaptado de (111).

Figura 2.34 - Representação esquemática da determinação do fator de assimetria e alargamento do pico cromatográfico.

Fonte: Adaptado de (33).

2.4 Validação de metodologia

O processo de validação tem por objetivo garantir se os dados gerados no método desenvolvido são confiáveis e se podem ser aplicados em análise de rotina. Vários artigos e livros dedicados ao processo de validação têm sido publicados. (112-115) No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RE nº 899 possui recomendações para validação em métodos bioanalíticos. (116) Além disso, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) fornece guias de validação analítico através do documento DOQ-CGCRE- 008. Essas recomendações também podem ser encontradas em órgãos internacionais tais como a *European Medicine Agency* (EMA) e a *Food and Drug Administration* (FDA). (117, 118)

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de métodos de separação são a seletividade, linearidade, faixa de trabalho ou aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, efeito matriz, robustez e estabilidade. A seguir, uma breve descrição dos principais parâmetros avaliados.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Os guias de validação recomendam utilizar de cinco a seis concentrações diferentes para avaliar a linearidade do método. Após a construção da curva analítica através do gráfico de resposta do equipamento (normalmente área) em função da

concentração do analito avalia-se matematicamente a correlação entre os dados obtidos através do método de mínimos quadrados para obter uma função do primeiro grau:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 13}$$

onde y é a resposta analítica do equipamento, x é a concentração do analito, a é o coeficiente angular e b é o coeficiente linear.

A curva analítica pode ser obtida através da padronização externa, padronização interna ou padronização por adição de padrão.

A faixa de trabalho compreende os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados.

A seletividade do método é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A sensibilidade do método avalia a capacidade de discriminar concentrações próximas de um analito. Esse termo não deve ser confundido com detectabilidade no qual avalia os limites de detecção e quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito detectado na amostra que pode ser diferenciada do ruído da linha de base. O LD pode ser estabelecido como sendo três vezes o valor do ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade que pode ser determinada na amostra com precisão e exatidão adequada e pode ser estabelecido como sendo dez vezes o valor do ruído da linha de base (Figura 2.35).

Figura 2.35 – Relação sinal-ruído (S/R).

A precisão (repetibilidade) é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) a partir da Equação 14.

$$\text{Precisão (DPR \%)} = \left(\frac{DP}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

onde DP é o desvio padrão das concentrações e $\bar{x}$ é a concentração média calculada.

A precisão intra-dia, também conhecida como precisão intra-corrida, analisa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, amostra e instrumentação. Já a precisão inter-dia (inter-corrida) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes.

A exatidão do método analítico é a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro e pode ser obtida pela Equação 15.

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{(\text{concentração experimental} - \text{concentração teórica})}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

De forma análoga aos ensaios de precisão, também é avaliada a exatidão intra-dia e inter-dia.

A reprodutibilidade avalia a concordância dos resultados utilizando o mesmo método, mesma amostra com diferentes equipamentos, analistas e laboratórios. O desvio padrão dos ensaios de reprodutibilidade é cerca de duas vezes maior que os ensaios de repetibilidade. Quando não há possibilidade de realizar os ensaios em condições de reprodutibilidade interlaboratorial pode-se avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial no qual os experimentos são conduzidos no mesmo laboratório, equipamento e amostra, e variando analista e temperatura da sala por exemplo. Os resultados são expressos em termos de precisão e exatidão.

A recuperação avalia a eficiência de extração do método analítico. O método mais comum de avaliar a recuperação é através de recuperação absoluta que é expressa em percentagem do analito extraído de um branco fortificado em relação a uma amostra solução que não foi submetida ao processo de extração (Equação 16). Já a recuperação relativa é a razão da quantidade do analito extraído na matriz com a quantidade do analito extraído em uma solução que não contenha a matriz.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{concentração do analito extraído}}{\text{concentração da solução padrão}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

A avaliação do efeito matriz tem por objetivo verificar a influência das substâncias presentes na matriz no sinal correspondente aos analitos de interesse. O efeito matriz pode causar alterações nos resultados analíticos tais como aumento no sinal analítico do detector levando a superestimação do resultado ou supressão do sinal analítico levando a subestimação do resultado (Equação 17).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{\text{área do analito fortificado após extração da matriz}}{\text{área do analito em solvente}} \right) \quad \text{Equação 17}$$

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos (extração e análise) e indica sua confiança durante o uso do método. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A robustez pode ser avaliada de forma univariada no qual a influência dos parâmetros é avaliada separadamente. O teste de Youden é outra maneira de avaliar a robustez do método. Esse teste possui um projeto fatorial fracionário no qual avalia a influência de sete variáveis em dois níveis diferentes (Tabela 2.3). (119) As letras maiúsculas representam os valores nominais ou padrão do método desenvolvido e as letras minúsculas as variações a serem estudadas. Assim, neste teste são realizados oito experimentos de forma aleatória com a combinação fatorial dos parâmetros avaliados e verifica-se qual o efeito ou combinações de efeitos que influenciam no resultado final (Tabela 2.4). Para cada experimento realizado a

Tabela 2.3 – Efeitos e variações na robustez avaliada pelo método de Youden.

Efeito	Condição Nominal	Variação
A/a	A	a
B/b	B	b
C/c	C	c
D/d	D	d
E/e	E	e
F/f	F	f
G/g	G	g

Tabela 2.4 - Matriz de Youden.

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADO	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

resposta obtida é representada pelas letras de *s* a *z*. Para comparar a influência da variação de cada parâmetro, deve-se calcular a diferença da média (D_i) dos valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos valores referente às letras minúsculas como representado pela Equação 18.

$$\text{Efeito A/a} = D_a = \frac{s+t+u+v}{4} - \frac{w+x+y+z}{4} \quad \text{Equação 18}$$

$$\text{Efeito B/b} = D_b = \frac{s+t+w+x}{4} - \frac{u+v+y+z}{4}$$

Para avaliar se as modificações tem influência na robustez é necessário calcular o desvio padrão das diferenças (S_{Di}) através da Equação 19.

$$S_{Di} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad \text{Equação 19}$$

O estudo de estabilidade visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Assim, é fundamental avaliar a estabilidade das soluções padrões, estabilidade da amostra após ciclos de congelamento/descongelamento, em temperatura ambiente e também nas condições de análise.

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Assim, algumas recomendações sobre os parâmetros avaliados estão representados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Parâmetros cromatográficos recomendados durante a validação.

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k)	$k > 2$, o sinal referente ao analito dever estar separado do sinal referente ao tempo morto e possíveis interferentes.
Número de pratos (N)	Em HPLC recomenda-se um valor maior que 2000 pratos na coluna analítica.
Fator de separação (α)	$\alpha > 1$
Fator de alargamento (TF)	$TF < 2$
Assimetria ($As_{10} \%$)	$As_{10} \% < 2$
Resolução cromatográfica (R_s)	$R_s > 1,50$ para picos com intensidade similar e com assimetria próxima de 1,00. $R_s > 2,00$ para os demais casos.

Capítulo 3

Determinação de fluoxetina e norfluoxetina em plasma humano por HPLC-UV utilizando a técnica de SPE com sorvente C18 sintetizado com precursores de sílica de baixo custo

3.1 Introdução

Como já discutido no Capítulo 2, materiais baseados em sílica podem ser obtidos por diferentes metodologias. Neste sentido, de acordo com o método utilizado a sílica pode ser classificada com do tipo A, no qual possui uma baixa pureza em relação a presença de metais; sílica tipo B que possui uma pureza elevada e usa principalmente precursores alcoxissilanos; e sílica tipo C que possuem a alta pureza da sílica tipo B, porém são polímeros híbridos. Atualmente, há uma crescente vertente na qual sílica de alta pureza (sílica tipo B) tem sido empregada em métodos de preparo de amostra, principalmente em SPE. Entretanto o custo dos reagentes alcoxissilanos comparados com os precursores da sílica tipo A (silicato de sódio) são muito elevados. Assim, dependendo da aplicação, é economicamente vantajoso empregar suportes baseados em sílica tipo A, mesmo que seja necessária uma purificação prévia dos reagentes. A Tabela 3.1 apresenta a comparação de preços e pureza entre os precursores de sílica obtidos através de catálogo *online* da empresa Sigma-Aldrich. (120)

3.2 Fármacos antidepressivos

Fluoxetina (FLX) é uma fenoxi-fenil-propalamina que pertence à classe dos inibidores seletivos de recaptação da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e tem se destacado mundialmente no tratamento de transtornos psiquiátricos (depressão) e também de outras síndromes, tais como a bulimia nervosa, ansiedade, distúrbios alimentares, síndrome do pânico e desordem obsessiva-compulsiva. (121)

Tabela 3.1 – Custo estimado dos precursores de sílica.

Reagente	Quantidade	Preço estimado (R\$) ^a
TEOS 99,999 %	1 L	7020,00
TEOS 99,0 %	1 L	410,00
TEOS 98,0 %	1 L	297,00
TMOS 98,0 %	1 L	1630,00
Silicato de sódio em solução - grau reagente	1 L	114,00
Silicato de sódio sólido - grau reagente	1 kg	106,00

^a Valor obtido no dia 12/11/2012

A FLX é administrada pela via oral e, posteriormente, metabolizada no fígado formando o metabólito ativo norfluoxetina (NFLX), também conhecido como desmetilfluoxetina, a qual é a molécula da FLX que sofreu o processo de desmetilação (desmetilfluoxetina).

A dose utilizada de FLX para o tratamento da depressão varia de 20 - 40 mg por dia e seus níveis terapêuticos abrangem a faixa de 50 a 300 ng mL⁻¹. Esses fármacos apresentam uma eliminação lenta no organismo, pois a meia-vida da FLX é de 1 a 3 dias quando utilizada em administração aguda e de 4 a 6 dias em usos crônicos. Já a NFLX apresenta uma meia-vida de 9 a 16 dias tanto no uso agudo quanto no crônico. Assim, o uso crônico da FLX leva a significativa acumulação de espécies ativas. Estudos tem revelado que a administração de 40 mg por dia de FLX num período de 30 dias fornece uma concentração plasmática de FLX e NFLX na faixa de 91 – 302 ng mL⁻¹ e 72 – 258 ng mL⁻¹ respectivamente.

Como característica química, a FLX apresenta um $\log P$ de 4,05, pK_a de 8,7. Já a NFLX apresenta um pK_a no valor de 9,37. A Figura 3.1 apresenta a estrutura química da FLX, NFLX e CLO (padrão interno).

Diferentes métodos analíticos estão disponíveis na literatura para análise de fluoxetina em plasma. A maioria dos métodos utiliza a técnica de HPLC empregando a detecção por ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FLD) ou espectrometria de massas (MS). Entre as técnicas de preparo de amostra, os trabalhos tem relatado o uso de LLE, SPE, SPME, SBSE, LPME, *in-tube* SPME em diferentes modos de operação (*off-line* e *online* por exemplo). (5, 122-131)

Figura 3.1 - Estrutura química da fluoxetina (1), norfluoxetina (2) e clomipramina (3) - padrão interno.

3.3 Objetivos

O objetivo desta parte da tese foi sintetizar um suporte cromatográfico baseado em sílica pelo método sil-gel empregando precursores de sílica de baixo custo (silicato de sódio). Posteriormente, após a funcionalização com grupamento C18 monofuncional e caracterização química, a fase extratora foi utilizada no desenvolvimento do método de extração em fase sólida (SPE) para a análise de fluoxetina e seu metabólito, norfluoxetina, em plasma humano utilizando o sistema HPLC-UV. Finalmente, o método foi validado e aplicado em amostras reais de plasma. Além disso, uma comparação do desempenho da extração da fase desenvolvida foi realizada com fases disponíveis comercialmente.

3.4 Parte experimental

3.4.1 Materiais e reagentes

Silicato de sódio em solução (28 % SiO_2) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi utilizado com fonte de sílica. Ácido clorídrico (Fluka, Suíça), ácido fórmico (Synth, Brasil), hidróxido de amônio (Fluka, EUA) e etanol (Tedia, EUA), todos grau reagente foram utilizados sem purificação adicional. Acetonitrila e metanol, ambos da Tedia (EUA) e grau HPLC foram usados no trabalho. A água ultrapura foi fornecida pelo sistema Elga Purelab Ultra (Inglaterra). Resina de troca catiônica Amberlite IR-120 na forma H^+ foi adquirida da Synth (Brasil). A separação granulométrica foi realizada com peneiras da marca Granutest (Brasil). Para funcionalização das partículas de sílica foram usados tolueno (Mallinckrodt, Mexico), imidazol (Mallinckrodt, EUA), piridina (Merck, Alemanha), dimetilamina (Merck, Alemanha) e octadecildimetilclorosilano (ODS) (Aldrich, EUA).

Os padrões analíticos de fenantreno, antraceno e criseno foram adquiridos da Supelco (Alemanha) e os padrões de fluoxetina (FLX), norfluoxetina (NFLX) e clomipramina (CLO) foram adquiridos da Sigma (Alemanha).

3.4.2 Síntese e caracterização das partículas C18

3.4.2.1 Preparação de partículas de sílica

Em um béquer de 100 mL foi adicionado 40 mL de silicato de sódio em solução (SiO_2 28 %) e completado com água ultrapura para volume final de 150 mL. Essa solução foi percolada em uma coluna cromatográfica aberta (50 cm x 2 cm) preenchida com resina de troca catiônica Amberlite IR-120 na forma H^+ com o uso da gravidade. O eluato foi recolhido e apresentou um pH igual a 2,6. Utilizando solução de NH_4OH 1,0 M, o pH da solução foi ajustado para 4,5. A solução foi transferida para uma vasilha de plástico com tampa na qual se iniciou a formação do polímero. Após a gelificação, o hidrogel ficou 3 dias em repouso. Após esse período, o hidrogel foi lavado com água ultrapura e posteriormente com EtOH. O hidrogel foi inserido na estufa com temperatura de 40°C por 24 horas. Em seguida, a temperatura foi aumentada gradativamente num período de 24 h até atingir a temperatura de 100°C e permaneceu nesta temperatura durante 24 h.

Após esse processo as partículas de sílica sintetizadas foram classificadas de acordo com seu diâmetro em peneiras com aberturas de malhas específicas. As partículas com diâmetro entre 38 e 72 μm foram recolhidas e utilizadas nos experimentos seguintes.

3.4.2.2 Funcionalização das partículas de sílica

Em um balão de duas bocas acoplado ao condensador Friedrich sob atmosfera de nitrogênio foi adicionado 10 g da sílica com tamanho de partículas entre 38 – 72 μm em 50 mL de tolueno. Em seguida foi adicionado 1,7 g de imidazol dissolvido em 3 mL de tolueno e posteriormente 5,4 g de ODS em 10 mL de tolueno. O sistema ficou em refluxo por 5 horas com aquecimento por banho de óleo. As partículas de sílica funcionalizadas foram filtradas e lavadas com 20 mL de tolueno, metanol, metanol:água (1:1) e metanol. A sílica foi seca em estufa a temperatura de 120°C.

3.4.2.3 Caracterização físico-química

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss-Leica/440) operando a 20 kV e as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. A área superficial e o diâmetro do poro foram medidos pela isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77K (Quantachrome Instruments) pelo método Braunaer-Emmett-Teller (BET). Análise elementar foi realizada em um analisador CHNS-O, modelo EA 1110 da CE Instruments. Os espectros de infravermelho (FT-IR) foram obtidos de 4000 a

400 cm^{-1} no equipamento Bomem MB-102 empregando disco de KBr para preparar as amostras.

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance III (400 MHz) com rotores de óxido de zircônio de 4 mm, velocidade de rotação de 5 kHz e campo magnético de 9,4 T. Análise de ^{29}Si RMN foram adquiridas a 79,46 MHz empregando a técnica de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP/MAS) com largura de pulso ($\pi/2$) de 5 μs , tempo de contato de 5 ms e intervalo entre os pulsos de 5 s. A temperatura da análise foi de 20,76°C, o número de scans foi de 3600 e ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico ($\delta = 0$ ppm) foi utilizado como padrão externo dos deslocamentos químicos. Os espectros de RMN ^{13}C foram adquiridos a 100,56 MHz empregando a técnica de polarização cruzada, rotação no ângulo mágico e supressão das bandas laterais (CP/MAS/TOSS) com largura de pulso ($\pi/2$) de 5 μs , tempo de contato de 2 ms e intervalo entre os pulsos de 5 s. A temperatura da análise foi de 21,80°C, o número de scans foi de 2048 e o adamantano ($\delta = 38.48$ ppm para o sinal mais intenso) foi utilizado como padrão externo dos deslocamentos químicos.

3.4.3 Aplicabilidade das partículas de sílica C18 *labmade* em extração em fase sólida

3.4.3.1 Preparo das soluções

Soluções estoque de FLX e CLO (padrão interno) foram preparadas em metanol na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e NFLX na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as quais foram mantidas em freezer para conservação. Essas soluções foram diluídas para soluções intermediárias de FLX, NFLX e CLO a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Soluções trabalho de FLX e NFLX a 5,0, 1,0 e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas a partir das soluções intermediárias. Essas soluções foram usadas para fortificar as amostras de plasma usadas no processo de validação.

3.4.3.2 Tratamento das amostras de plasma

As amostras de plasma humano foram centrifugadas a 11178 g por 5 minutos e filtradas através de membrana hidrofílica de policarbonato (1,2 μm x 13 mm). Para atingir as

concentrações desejadas dos fármacos, alíquotas da solução trabalho de FLX, NFLX e CLO foram transferidas para frascos do tipo *ependorf*, secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspensas em 500 μ L de plasma isento dos analitos estudados. As amostras foram homogenizadas no ultrassom por 5 minutos e diluídas com água ultrapura para volume final de 1 mL.

A extração da FLX, NFLX e CLO foi realizada utilizando seringas plásticas de SPE com capacidade de 1 mL contendo 100 mg da sílica C18 sintetizada (*labmade*) entre os *frits* de polipropileno com 20 μ m de abertura da malha. Os cartuchos preparados no laboratório foram condicionados com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. Após esta etapa, 1 mL da amostra diluída foi percolada pelo cartucho de extração. O *clean up* foi realizado com 3 mL de água e 3 mL de uma mistura H₂O:ACN (80:20). Posteriormente os cartuchos foram secos sob pressão reduzida por 3 minutos. Os analitos foram eluídos utilizando 3 mL de uma solução de metanol contendo 0,2 % de ácido fórmico. O eluato foi evaporado a secura com fluxo de nitrogênio e temperatura do banho à 40°C. Por fim, os analitos foram reconstituídos em 500 μ L da fase móvel, as amostras foram homogenizadas em vórtex por 20 s, transferidas para *vials* e colocadas no amostrador automático do HPLC no qual 10 μ L da amostra foram injetadas no equipamento.

3.4.3.3 Método cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida consistiu de um HPLC série Prominence 20A da Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema consistiu de duas bombas LC-20AD, um amostrador automático SIL-20A, um forno cromatográfico CTO-20A, um detector UV SPD-20A e uma controladora CBM-20A. O software LC-Solution (Shimadzu) controlou os módulos do sistema cromatográfico.

Os fármacos foram separados em uma coluna analítica NST C18 (2,1 mm x 150 mm x 5 μ m) com vazão de 0,2 mL min⁻¹ em modo isocrático. A fase móvel de separação foi composta de uma mistura 50:50, v/v de ACN:H₂O. A fase aquosa era composta por acetato de amônio (10 mM) e TEA (3,6 mM) tamponados em pH 5,40 com ácido acético. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C e o detector foi ajustado a 226 nm.

3.4.3.4 Validação do método

O método para análise de FLX e NFLX em plasma humano através de SPE *off-line* e HPLC-UV foi validado segundo critérios aceitos pela comunidade científica. Os parâmetros de validação selecionados foram: especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão intra e inter-dias, recuperação absoluta, efeito matriz e robustez do método.

A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostra de plasma livre dos fármacos estudados (branco) em três réplicas e observando a presença ou não de interferentes no tempo de retenção dos fármacos.

A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas construídas por calibração externa e padronização interna, realizando a fortificação do plasma e submetendo as amostras ao processo de extração e análise cromatográfica. Cinco níveis de concentração (15, 50, 100, 250 e 500 ng mL⁻¹) em quintuplicatas foram utilizados na construção da curva analítica totalizando um n = 25 para cada fármaco analisado. Em todos os ensaios utilizou-se CLO na concentração de 500 ng mL⁻¹ como padrão interno. O coeficiente de determinação (r^2) e a equação linear de regressão ($y = ax + b$) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados. O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo três vezes a amplitude do ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) como sendo no mínimo dez vezes a amplitude do ruído da linha de base.

A precisão intra-dia foi avaliada em triplicata em três níveis diferentes 15 ng mL⁻¹ (baixo), 100 ng mL⁻¹ (médio) e 500 ng mL⁻¹ (alto) em dois dias diferentes, e a precisão inter-dia foi avaliada com os resultados dos dois dias de coleta dos dados. Os resultados destes ensaios foram expressos em desvio padrão relativo (DPR). Analogamente ao ensaio de precisão, foi calculada a exatidão intra e inter-dia, nos mesmos níveis e os resultados foram apresentados em percentagem de desvio.

A recuperação foi determinada por meio de análises de amostras de plasma fortificado com FLX e NFLX (baixo, médio e alto) em triplicata. Os valores obtidos foram expressos como percentagem da quantidade extraída.

O efeito matriz do método foi avaliado realizando a comparação das áreas relativas dos fármacos no extrato obtido da matriz e em solvente.

A robustez do método foi avaliada no modo univariado no qual quatro parâmetros (vazão da fase móvel, temperatura do forno, percentagem de solvente orgânico na fase móvel e comprimento de onda) foram verificados em dois níveis de variação.

3.4.3.5 Determinação do fármaco em amostras de plasma humano

A aplicabilidade do método foi demonstrada na determinação de FLX e NFLX em amostras de plasma de pacientes sob tratamento de FLX. As amostras doadas foram mantidas congeladas antes de sua análise.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 Síntese e caracterização da sílica C18

A Figura 3.2 exemplifica o esquema geral utilizado na síntese da fase extratora sílica C18 empregando precursor de baixo custo. O silicato de sódio em solução apresenta um grande número de átomos de sódio e também de outros metais devido sua baixa pureza. A utilização de resina hidrogeniônica para eliminação de metais do silicato de sódio é necessária para promover uma maior homogeneidade na superfície da sílica, além de evitar o aumento da acidez dos silanois devido a presença de metais incorporados na rede polimérica da sílica. Assim, foi realizada a remoção dos metais percolando a solução de silicato de sódio em uma coluna aberta contendo resina hidrogênionica. Um ponto importante nesta etapa da síntese é o controle do pH no experimento. A solução de silicato de sódio apresenta pH próximo de 12 e, a medida que ocorre a troca dos átomos metálicos desta solução com o hidrogênio da resina catiônica, há uma diminuição do pH. O processo de polimerização do ácido silícico para a formação do hidrogel ocorre rapidamente com pH entre 5 e 7. Se durante a remoção de metais

Figura 3.2 – Esquema geral da síntese da sílica C18.

da solução o pH atingir essa faixa crítica, ocorre a polimerização do ácido silícico dentro da coluna e, portanto, seu entupimento. Assim, é importante manter o pH do eluente próximo a 2 no qual a solução aquosa de ácido silícico apresenta uma maior estabilidade e, portanto, demanda de um maior tempo para polimerização.

O eluente da coluna cromatográfica contendo o ácido silícico (Si(OH)_4) apresentou pH 2,6 e esta solução foi ajustada ao pH 4,5 para promover a formação da rede polimérica da sílica. Após a formação do hidrogel, o mesmo ficou em repouso por três dias para reforçar a ligação dos siloxanos (SiO_2) e, também, a resistência mecânica do material.

Após a secagem do material as partículas de sílica apresentaram distribuição granulométrica na faixa de 0,5 – 110 μm . Assim, para a utilização dessas partículas com fase extratora, foi necessário separar as partículas por faixas de diâmetro empregando peneiras com abertura de malhas específicas. Partindo de 120 mL de silicato de sódio foi possível sintetizar aproximadamente 25 g de sílica na faixa de 38 - 72 μm para serem utilizadas como fase extratora em SPE (Figura 3.3). Aproximadamente 10 g da sílica passaram pela peneira com a malha de 38 μm (Figura 3.4), entretanto não foi utilizada esta fração de material para os demais experimentos.

Para fins comparativos, foi sintetizado partículas de sílica sem a remoção dos metais. Assim, a solução silicato de sódio teve seu pH ajustado para 2 utilizando HCl para a formação do ácido silícico. Posteriormente, o pH foi elevado para 4,5 com hidróxido de amônio e, consequentemente, o hidrogel foi formado e todas as etapas seguintes foram realizadas

Figura 3.3 – MEV das partículas de sílica obtidas para SPE na faixa de 38 - 72 μm

Figura 3.4 – MEV das partículas de sílica obtidas abaixo de 38 μm

conforme citado anteriormente. Como resultado, as partículas obtidas não apresentaram a mesma homogeneidade que as partículas sintetizadas através da remoção dos metais (Figura 3.5).

Pela análise de EDS da partícula de sílica podemos observar a presença de átomos de silício e oxigênio no material (Figura 3.6). A ausência do sinal de sódio vem em concordância com o processo de troca catiônica realizado com o precursor silicato de sódio em solução. O preparo do suporte foi realizado 4 vezes e o material final apresentou características similares. Assim, o método de preparo possui repetibilidade.

Após o preparo do suporte cromatográfico, as partículas foram submetidas a funcionalização com o grupamento C18 monofuncional. Antes da reação, as partículas foram ativadas em estufa a 120°C por 24 h para remoção de moléculas de água da superfície da sílica para aumentar a eficiência da etapa de funcionalização.

Figura 3.5 – MEV das partículas de sílica obtidas sem a remoção dos metais.

Figura 3.6 – EDS das partículas de sílica obtidas para SPE na faixa de 38 - 72 μm .

Foi avaliada a funcionalização empregando três aminas diferentes (imidazol, piridina e dietilamina) como catalisadores da reação. A quantidade de carbono adicionada quimicamente a superfície das partículas de sílica foi mensurada através de análise elementar e os resultados encontram-se na Tabela 3.2. Podemos observar que as partículas de sílica sem a funcionalização apresentam quantidades de carbono em sua estrutura praticamente nula e após a funcionalização as quantidades inseridas variaram de 19 a 24 % de carbono confirmando a eficiência no processo de funcionalização.

Para a funcionalização de uma maior quantidade de sílica, foi utilizado como catalisador o imidazol. Como resultado, o material obtido apresentou 22,3 % de carbono em sua estrutura.

A fase extratora foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho (Figura 3.7). A banda larga e intensa na região de 1300 a 1000 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico Si-O-Si, o pico na região de 950 cm^{-1} ao estiramento assimétrico Si-OH e aquele em 790 cm^{-1}

Tabela 3.2 – Análise elementar das partículas de SPE *labmade*.

SPE <i>labmade</i> - 38-72 μm				
Linha		%C	%H	%N
1	Sem funcionalização	0,06	2,46	-
2	C18 - imidazol	23,92	5,15	-
3	C18 - piridina	20,18	4,65	-
4	C18 - dietilamina	19,38	4,36	-

Figura 3.7 - Espectro de infravermelho da sílica pura e sílica C18. Bandas: (1) O-H, (2) C-H, (3) O-H, (4) Si-O-Si, (5) Si-OH, (6) Si-O e (7) Si-O.

e 470 cm^{-1} ao estiramento simétrico Si-O. A banda larga na região 3500 cm^{-1} , é atribuída aos estiramentos do grupo silanol. Observa-se também em torno de 1644 cm^{-1} a deformação O-H. Após a reação de funcionalização com ODS, podemos observar o aparecimento de banda na região de 2940 cm^{-1} referente aos estiramentos de carbono alifático (C-H). Adicionalmente, a formação da ligação química entre os grupos silanol e ODS promoveu uma redução da banda atribuída ao estiramento O-H.

A espectroscopia de RMN assim como o FT-IR é uma ferramenta utilizada para verificar a estrutura da sílica e os grupos presentes na fase estacionária. A investigação por esta técnica auxilia na caracterização das espécies presentes na sílica, visto que, por infravermelho essa diferenciação é dificultosa. A sílica pura apresenta-se em unidades tetraédricas unidas por grupos siloxano (Q^4) e sua superfície pode apresenta silanois geminais (Q^2), que são dois grupos OH ligados em um átomo de silício, e também silanois isolados e vicinais (Q^3) que são um grupo OH ligado em um átomo de silício (Figura 3.8).

No espectro de RMN/CP/MAS ^{29}Si da sílica antes do processo de funcionalização (Figura 3.9A) podemos observar que o sinal em $-111,99\text{ ppm}$ é atribuído a espécie Q^4 , característica para todo material baseado em sílica. O sinal em $-103,09\text{ ppm}$ e $93,59$ são referentes a espécie Q^3 e Q^2 , respectivamente. A Figura 3.9B representa o espectro de ^{29}Si após a funcionalização da sílica com ODS. Podemos observar a presença das espécies Q^2 , Q^3

Figura 3.8 – Nomenclatura das espécies de sílica. Silício ligado ao carbono (M); silanol geminal (Q^2); silanol isolado (Q^3) e siloxano (Q^4).

Figura 3.9 – Espectro de ^{29}Si RMN/CP/MAS da sílica sintetizada antes da funcionalização (A) e após a funcionalização (B).

e Q⁴ e também o surgimento de um sinal em 12,13 ppm, atribuído ao átomo de silício ligado ao grupamento C18 monofuncional (M).

O espectro de ¹³C RMN/CP/MAS/TOSS foi utilizado para confirmar a estrutura química da sílica C18 monofuncional (Figural 3.10). O carbono C_{1'} apresenta deslocamento químico no campo alto do espectro (0,00 ppm) devido a blindagem contra o campo magnético. Os sinais em 18,50 e 23,99 ppm são atribuídos aos carbonos C₁ e C₂/C₁₇ respectivamente. O carbonos C₃ e C₁₆ aparecem em campo mais baixo do espectro, com sinais em 34,68 ppm e 32,95 ppm. O sinal mais intenso em 30,92 ppm é referente aos carbonos centrais (C₄₋₁₅) ao longo da cadeia octadecil. Esse deslocamento químico dos carbonos centrais indica que a cadeia carbônica encontra-se na posição desordenada, na qual ocorre uma rápida troca desses carbonos entre as conformações *trans* e *gauche*. (132) Quando a cadeia carbônica possui a conformação *trans* predominante, um deslocamento químico em torno de 33 ppm é esperado para os carbonos centrais. Contudo, quando os carbonos estão em conformação desordenada ocorre uma mudança na blindagem eletrônica dos átomos de

Figura 3.10 – Espectro de ¹³C RMN/CP/MAS/TOSS da sílica C18 sintetizada.

carbono e um deslocamento químico de 2 – 3 ppm é esperado para a região de campo alto do espectro (aproximadamente 30,5 ppm).

3.5.2 Avaliação da fase extratora

A avaliação da extração da fase C18 sintetizada foi realizada com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs ou PAHs, sigla em inglês (*polycyclic aromatic hydrocarbon*)) para avaliar a capacidade de extração de compostos não polares. Os PAHs são compostos orgânicos semivoláteis formados em processos de combustão a alta temperatura. (133) O processo de queima incompleta de materiais orgânicos, que contém cadeias carbônicas em sua estrutura, é a principal fonte de emissão de PAHs. As principais fontes são a queima de combustível fóssil em processos industriais, motores de automóveis, sistemas de aquecimento domésticos (com carvão mineral ou gás butano), incineração de resíduos domésticos e industriais, fumaça de cigarros e refinarias de petróleo. Ainda várias fontes naturais, incluindo a queima de biomassa em florestas e erupções vulcânicas são consideradas emissoras de PAHs.

Os PAHs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados, e tem recebido muita atenção nos últimos anos devido ao fato de que muitos compostos desse grupo são potentes carcinógenos. A Figura 3.11 apresenta a estrutura dos três PAHs empregados no processo de extração.

Para o processo de extração, 100 mg da fase extratora foi inserida no cartucho de extração. Posteriormente, a fase foi condicionada com metanol (3 mL) e água ultrapura (3 mL). Em seguida, 10 mL de água ultrapura fortificada com PAHs (50 ng mL^{-1}) foram percoladas pelo cartucho e, posteriormente, os analitos foram eluídos com 2 mL da acetonitrila. Após a evaporação com fluxo de nitrogênio em banho de gelo para minimizar a

Figura 3.11 – Estrutura química dos PAHs. (1) fenantreno, (2) antraceno e (3) criseno.

perda dos PAHs, os analitos foram reconstituídos em 1 mL da fase móvel (ACN:H₂O, 65:35, v/v) e um volume de 10 µL foi injetado no HPLC 20A da Shimadzu. Assim, o processo de extração forneceu um fator de concentração de 10 vezes para os analitos. A coluna cromatográfica utilizada foi a uma NST C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) com vazão de 0,2 mL min⁻¹ com eluição isocrática. O forno cromatográfico operou a 30°C e o comprimento de onda monitorado foi o 254 nm.

Para efeito comparativo, os padrões de PAHs na concentração de 500 ng mL⁻¹ foram analisados no sistema cromatográfico. A Figura 3.12 apresenta os cromatogramas da injeção do padrão dos PAHs com a amostra de água fortificada. O experimento foi realizado em triplicata e a comparação entre as áreas dos dois cromatogramas mostra que a recuperação dos PAHs variou entre 71 e 85 %.

3.5.3 Aplicação das partículas *labmade* na análise de antidepressivo

3.5.3.1 Desenvolvimento do método de análise

Fase extratora baseada em sílica C18 é interessante para a extração de compostos

Figura 3.12 – Perfil cromatográfico da separação dos PAHs em solvente (vermelho) e após a extração em água (preto). Ordem de eluição: fenantreno (1), antraceno (2) e criseno (3).

apolares em matriz polar, tais como o plasma. Adicionalmente, além da interação hidrofóbica com o C18, a presença de silanos residuais na superfície da sílica favorece interações secundárias de característica iônica. Assim, compostos contendo grupamento amino podem interagir com os silanos através de ligações de hidrogênio. Desta forma, os analitos podem ter sua retenção no cartucho de extração aumentada e, conseqüentemente, melhores resultados de recuperação.

Inicialmente, a etapa de extração foi avaliada utilizando água fortificada com FLX, NFLX e CLO na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Após o condicionamento do cartucho de extração contendo 100 mg da fase extratora *labmade*, 1 mL da solução fortificada foi aplicada e, em seguida os analitos foram eluídos com 3 mL de metanol puro ou metanol contendo 0,2 % de ácido fórmico. O eluato foi evaporado com fluxo de nitrogênio a temperatura de 40°C e redissolvido em 1 mL da fase móvel (mistura 50:50 de ACN:acetato de amônio (10 mM) + TEA (3,6 mM) tamponados em pH 5,4 com ácido acético). Uma alíquota de 10 μL foi injetada no sistema cromatográfico contendo coluna em fase reversa e monitoramento do comprimento de onda de 226 nm. A Figura 3.13 apresenta o cromatograma da separação dos fármacos e pode-se perceber que os picos estão bem resolvidos e simétricos. O fator de retenção dos fármacos obtidos foi adequado (entre 2,8 e 7,5). Assim, o primeiro composto (NFLX) não eluiu próximo ao tempo morto e o último composto não ficou muito retido na coluna provocando longo tempo de análise.

Figura 3.13 – Cromatograma da separação cromatográfica da norfluoxetina (1), fluoxetina (2) e clomipramina (3) na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A recuperação dos fármacos foi abaixo de 50 % quando se utilizou metanol puro na etapa de eluição do cartucho de extração. Desta forma, metanol acidificado com ácido fórmico (0,2 %) foi necessário para promover a diminuição das interações iônicas secundárias, pois sob condições ácidas, os silanois não se apresentam ionizados facilitando a remoção dos analitos da fase extratora.

Após a otimização do método de separação, o método de extração foi avaliado utilizando a matriz plasma fortificada com os fármacos. A influência dos interferentes, principalmente as proteínas, foi minimizada por meio da diluição da amostra de plasma em água (50 %). Adicionalmente, a etapa da diluição favoreceu a interação dos fármacos de interesse (FLX, NFLX e CLO) com a fase extratora C18. Além disso, houve uma redução da viscosidade da matriz, facilitando a percolação da amostra através do cartucho de extração.

O cromatograma da extração da amostra de plasma apresentou um grande número de interferentes e, portanto, o desenvolvimento da etapa de *clean up* se fez necessário. Foram avaliados metanol:água e acetonitrila:água nas proporções de 10:90, 20:80 e 30:70, v/v como solventes de lavagem do cartucho. A melhor condição encontrada para conciliar a remoção dos interferentes sem comprometer a eficiência da extração foi empregando metanol:água na proporção 20:80, v/v. A Figura 3.14 apresenta o cromatograma referente a extração do branco de plasma fortificado com os fármacos de interesse. Durante os experimento foi verificado que a seringa de extração poderia ser utilizada no máximo duas vezes sem comprometer o processo de extração.

Figura 3.14 – Cromatograma da separação cromatográfica de amostras de plasma com 250 ng mL⁻¹ de norfluoxetina (1) e fluoxetina (2) utilizando a clomipramina (3) como padrão interno (500 ng mL⁻¹).

3.5.3.2 Validação do método

Após o desenvolvimento da extração por SPE *off-line* seguida de análise por HPLC-UV, o método foi validado. A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras de plasma humano isento dos fármacos estudados. Foi avaliada a presença de interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção da FLX, NFLX ou CLO. A Figura 3.15 apresenta a extração do branco do plasma. Pode-se observar a ausência de interferentes no tempo de retenção da CLO, contudo, no tempo de retenção da FLX e NFLX houve um pequeno sinal analítico da matriz. Entretanto, os valores em área desses interferentes são inferiores a 10 % da área dos fármacos no nível baixo (LQ) e não apresentaram variação entre diferentes extrações. Assim, a presença desses compostos não influenciou no processo de validação do método desenvolvido. A linearidade e a faixa de trabalho na análise da FLX e

Figura 3.15 – Cromatograma do branco do plasma extraído.

Tabela 3.3 - Dados da curva analítica.

Fármaco	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Dados da equação (a, b)	Coefficiente de determinação (r ²)	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
FLX	15 - 500	1,01 x 10 ⁻³ 8,79 x 10 ⁻³	0,98937	4,3	15
NFLX	15 - 500	1,63 x 10 ⁻³ 0,0222	0,98861	4,2	15

NFLX foi avaliada de 15 a 500 ng mL⁻¹ (Tabela 3.3). Os coeficientes de determinação (r^2) foram maiores que 0,98 para FLX e NFLX, demonstrando haver uma correlação entre concentração e resposta obtida (Figuras 3.16 e 3.17). Adicionalmente, a linearidade foi avaliada pela análise do gráfico de resíduos no qual podemos observar que o modelo segue uma distribuição normal. O LQ foi estabelecido como sendo 15 ng mL⁻¹ com DPR abaixo de 20,0%. O LD para a FLX e NFLX foram estabelecidos como a concentração de 4,3 ng mL⁻¹ e 4,2 ng mL⁻¹, respectivamente.

Figura 3.16 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos na análise de FLX em plasma.

Figura 3.17 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtido na análise de NFLX em plasma.

Os estudos de precisão e exatidão intra e inter-dia foram realizados nos níveis baixo, médio e alto da curva analítica. Os resultados destes ensaios estão representados na Tabela 3.4 e 3.5. Foi considerado como limite máximo o valor de 15 % para os experimentos de precisão e exatidão, exceto para o limite inferior de quantificação (15 ng mL^{-1}), o qual se admitiu um valor de até 20%. Analisando esses resultados podemos concluir que o método desenvolvido apresentou precisão e exatidão adequada.

Tabela 3.4 - Precisões obtidas para o método desenvolvido (n = 3).

Fármacos	Níveis	Precisão	Precisão	Precisão
		intra-dia 1 (DPR %)	intra-dia 2 (DPR %)	inter-dia (DPR %)
FLX	Baixo	7,85	15,05	10,75
	Médio	7,12	10,81	9,84
	Alto	8,73	7,60	10,53
NFLX	Baixo	5,12	10,47	7,60
	Médio	10,52	12,11	13,38
	Alto	11,57	10,24	10,57

Baixo = 15 ng mL⁻¹, Médio = 100 ng mL⁻¹, Alto = 500 ng mL⁻¹

Tabela 3.5 - Exatidões obtidas para o método desenvolvido (n = 3).

Fármacos	Níveis	Exatidão	Exatidão	Exatidão
		intra-dia 1 (%)	intra-dia 2 (%)	inter-dia (%)
FLX	Baixo	16,83	12,99	14,91
	Médio	13,15	8,50	10,82
	Alto	13,21	1,61	7,43
NFLX	Baixo	10,45	15,06	12,75
	Médio	5,49	12,63	9,07
	Alto	4,26	3,47	3,86

Baixo = 15 ng mL⁻¹, Médio = 100 ng mL⁻¹, Alto = 500 ng mL⁻¹

A recuperação do método foi calculada por meio da razão das áreas relativas dos fármacos que foram fortificados antes do processo de extração e dos padrões fortificados após a extração de amostras branco. Os resultados deste experimento encontram-se na Tabela 3.6; os valores de recuperação ficaram entre 86,78 e 105,82 %, sendo considerado um nível aceitável entre 70 e 120 %.

O efeito matriz se mostra mais evidente quando se utiliza espectrômetros de massas para a detecção dos analitos de interesse. Entretanto, é importante avaliar este parâmetro quando se utiliza outros sistemas de detecção como, por exemplo, o UV-vis. Assim, o efeito matriz foi avaliado realizando a comparação da área relativa dos analitos na presença e na

ausência da matriz (Tabela 3.6). Os valores obtidos ficaram próximos de 100 % e, portanto, o método não apresentou efeito matriz significativo. Desta forma, a curva analítica para este método poderia ser construída em água.

A robustez do método foi avaliada de forma univariada, ou seja, um parâmetro de cada vez foi avaliado. A Tabela 3.7 apresenta o resultado da variação de cinco parâmetros (vazão da fase móvel, temperatura do forno, percentagem de solvente orgânico na fase móvel e comprimento de onda do detector UV). Os experimentos foram conduzidos no nível médio de

Tabela 3.6 – Recuperação e efeito matriz para o método desenvolvido (n = 3).

Fármacos	Níveis	Recuperação	Efeito matriz
		(%)	(%)
FLX	Baixo	92,84	3,98
	Médio	105,82	4,47
	Alto	101,55	1,67
NFLX	Baixo	86,78	5,19
	Médio	90,91	7,83
	Alto	92,69	4,33
CLO (PI)	-	94,53	1,69

Baixo = 15 ng mL⁻¹, Médio = 100 ng mL⁻¹, Alto = 500 ng mL⁻¹

Tabela 3.7 - Resultados da avaliação da robustez (n = 3).

Parâmetro avaliado	Nível da variação	Variação	Exatidão (%)	
			FLX	NFLX
Vazão da fase móvel	-	0,18 mL min ⁻¹	3,15	6,84
	0	0,20 mL min ⁻¹	1,79	2,30
	+	0,22 mL min ⁻¹	1,45	4,78
Temperatura do forno	-	33°C	3,56	4,82
	0	35°C	1,79	2,30
	+	37°C	2,58	3,38
Proporção fase móvel (ACN:H ₂ O tamponada)	-	47:53	3,51	2,98
	0	50:50	1,79	2,30
	+	53:47	12,75	7,32
Comprimento de onda	-	224 nm	12,54	10,78
	0	226 nm	1,79	2,30
	+	228 nm	9,65	11,48

fortificação (100 ng mL^{-1}), sendo a variação de cada parâmetro realizada em um nível abaixo e um acima do estabelecido no método desenvolvido. Os resultados foram expressos em percentagem de desvio do valor real (exatidão) e podemos observar que a variação nos parâmetros avaliados não alteraram os valores de concentração da FLX e NFLX de forma significativa.

3.5.3.3 Determinação do fármaco em amostras de plasma humano

Após a validação do método, sua aplicabilidade foi demonstrada pelo monitoramento em nível plasmático de FLX e seu metabólito, NFLX, de pacientes sob tratamento com este medicamento (20 mg/dia). A Tabela 3.8 apresenta os resultados da análise de seis amostras de plasma. A Figura 3.18 mostra a comparação dos cromatogramas da amostra número 6 com o plasma fortificado ($250 \mu\text{g L}^{-1}$ de FLX e NFLX). As concentrações de FLX e NFLX encontradas neste trabalho estão em concordância com outros trabalhos relatados na literatura científica. (5, 131, 134, 135)

3.5.3.3 Estudo comparativo com fases comerciais baseadas em sílica

O desempenho do processo de extração empregando as partículas de sílica C18 *labmade* foi comparado com duas fases extratoras comerciais baseadas em sílica C18. A primeira é um sorvente da empresa Alltech o qual possui *endcapping* e 6 % de carbono na sua estrutura. O segundo sorvente avaliado foi o Strata C18 da Phenomenex que possui 18 % de

Tabela 3.8 – Concentração de fluoxetina e norfluoxetina em plasma de pacientes sobre tratamento.

Amostra	FLX (ng mL^{-1})	NFLX (ng mL^{-1})
1	48,18	69,47
2	109,36	81,56
3	46,81	48,01
4	61,31	64,15
5	215,51	167,94
6	129,66	181,97

Figura 3.18 - Cromatograma do plasma fortificado com 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FLX e NFLX e amostra real com FLX (129,66 ng mL^{-1}) e NFLX (181,97 ng mL^{-1}) contendo 500 ng mL^{-1} de CLO.

carbono na sua estrutura. As características dos três sorventes avaliados encontram-se na Tabela 3.9.

As extrações utilizadas para comparação foram feitas em plasma fortificado. A mesma quantidade de sorvente (100 mg) foi empacotada em tubos de polipropileno e a extração e análise cromatográfica dos fármacos ocorreu conforme procedimento desenvolvido e validado. A Tabela 3.10 apresenta os valores de recuperações obtidas com as três fases extratoras em triplicata. Podemos observar que a fase extratora *labmade* apresentou valores de recuperação entre 86,78 e 105,86 %. O intervalo das recuperações obtidas com a fase da Alltech, quando comparados com a fase *labmade*, foi maior uma vez que os valores variaram

Tabela 3.9 – Característica dos sorventes avaliados.

Sorvente	Suporte	Carbono (%)	Endcapping	Tamanho da partícula (μm)	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro do poro (nm)
Labmade C18	Sílica	22	Não	38 - 72	607	4,6
Alltech C18	Sílica	6	Sim	50*	518	6
Strata C18	Sílica	18	Não	55*	500	7

* tamanho médio das partículas.

Tabela 3.10 – Comparativo de recuperação utilizando a fase extratora desenvolvida no trabalho e duas comerciais (n = 3).

Fármacos	Níveis	Recuperação <i>labmade</i> C18 (%)	Recuperação Alltech C18 (%)	Recuperação Strata C18 (%)
FLX	Baixo	92,84	125,26	83,60
	Médio	105,82	85,65	89,91
	Alto	101,55	119,06	86,28
NFLX	Baixo	86,78	116,30	89,67
	Médio	90,91	75,02	76,99
	Alto	92,69	110,98	79,28
CLO (PI)	-	94,53	96,47	87,12

Baixo = 15 ng mL⁻¹, Médio = 100 ng mL⁻¹, Alto = 500 ng mL⁻¹

entre 75,02 e 125,26 %. Já a fase Strata C18, a qual possui percentual de carbono próxima ao do sorvente desenvolvido, apresentou um percentual de recuperação inferior (76,99 – 89,91 %).

A Figura 3.19 ilustra a comparação das extrações com as três fases extradoras. Os picos cromatográficos 1, 2 e 3 representam FLX, NFLX e CLO respectivamente. Podemos

Figura 3.19 – Comparação da extração de plasma fortificado com diferentes sorventes.

observar que nas mesmas condições de extração, o cromatograma referente ao processo de extração com a fase desenvolvida no laboratório apresentou menos interferentes.

3.6 Conclusão

Suporte cromatográfico baseado em sílica foi obtido utilizando precursores de baixo custo em conjunto com a reação sil-gel. A purificação com resina catiônica promoveu a redução de possíveis contaminantes metálicos presentes no precursor silicato de sódio.

Após a funcionalização com grupamento C18, e caracterização físico-química, o sorvente apresentou bons resultados na extração dos fármacos fluoxetina e norfluoxetina.

A comparação do sorvente desenvolvido com sorventes disponíveis comercialmente demonstrou resultados similares em termo de recuperação. Entretanto, a extração realizada com a fase desenvolvida apresentou menor intensidade de picos atribuídos a interferentes.

O método desenvolvido para análise dos fármacos em plasma utilizando preparo de amostra por SPE *off-line* com o sorvente sintetizado seguida da análise cromatográfica por HPLC-UV apresentou resultados adequados para os parâmetros validados.

O método analítico foi aplicado com sucesso em amostras de plasma de pacientes sob tratamento com fluoxetina.

Capítulo 4

**Emprego de MISPE-HPLC-UV na determinação
online de anti-inflamatórios não esteroidais em urina
humana**

4.1 Introdução

4.1.1 Polímero molecularmente impresso

A alta seletividade do reconhecimento biomolecular das interações antígeno-anticorpo, fármaco-receptor e enzima-substrato, levaram os pesquisadores a desenvolverem linhas de pesquisa voltadas para o preparo de materiais que atuam como receptores sintéticos com seletividade para o composto de interesse. Linus Pauling foi um dos grandes pesquisadores a contribuir com estudos nesta área. (136, 137)

O primeiro trabalho relacionado com a síntese do MIP foi publicado por Polyakov em 1931 relacionando uma mudança na porosidade da sílica gel com a presença de benzeno, tolueno e xileno como aditivos sintéticos. (138) Já em 1949 Dickey publicou a extração seletiva do alaranjado de metila, etila, propila e butila usando matriz polimérica de sílica. (139) De 1930 até 1972 cerca de 40 publicações foram realizadas abordando a impressão molecular. (140) Entretanto, foi em 1972 com as pesquisas realizadas por Sarhan e Wulff e também por Takagishi e Klotz que a técnica ganhou destaque. (141, 142) Diferentemente dos trabalhos anteriores, nos quais a impressão ocorria com precursores inorgânicos, os polímeros sintetizados nestes dois grupos usaram precursores orgânicos. Contudo, a técnica ganhou visibilidade e popularidade como material para uso em preparo de amostra após os trabalhos publicados por Vlatakis e Morbach (143) em 1993 e Sellergren (144) em 1994. O primeiro demonstrou a aplicabilidade na extração da teofilina e diazepam em soro fortificado, com resultados comparáveis a técnica de imunoensaio. Já o segundo reportou o uso de pentamidina-MIP como fase extratora em SPE para a extração e pré-concentração dos analitos em amostras de urina seguida da dessorção *online* para o detector de UV. A partir destas pesquisas, o número de publicações relacionadas com a impressão molecular vem crescendo ao longo dos anos (Figura 4.1), e a técnica tem se tornando atrativa devido a geração de sítios de reconhecimento seletivo nos quais uma molécula alvo pode ser facilmente moldada na rede polimérica durante a síntese.

Podemos também analisar a distribuição das publicações relacionadas com MIP entre os países onde o pesquisador possui vínculo (Figura 4.2). Em primeiro lugar temos a China que representa 27 % das publicações nesta área, seguida pelos EUA (15 %) e Japão (10 %) O Brasil ocupa a 20ª posição com 52 publicações que representa apenas 1 % do total das publicações nesta área.

Figura 4.1 - Número de publicações relacionadas com MIP a partir de 1980.

Fonte: *Web of Science*. Dia da pesquisa: 19/10/2012 às 11 h. Busca por tópicos utilizando *molecular**, *imprint** e *polymer** como palavras-chave.

Figura 4.2 - Distribuição das publicações relacionadas com MIP.

Fonte: *Web of Science*. Dia da pesquisa: 19/10/2012 às 11 h. Busca por tópicos utilizando *molecular**, *imprint** e *polymer** como palavras-chave.

Na preparação dos MIPs duas estratégias de síntese podem ser empregadas para gerar interação dos grupos funcionais com as moléculas do *template*. A primeira envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre os monômeros do polímero e o *template* (Figura 4.3). Essa abordagem tem uma maior seletividade, pois diminui o número de sítios não seletivos nos materiais poliméricos. Contudo, para a remoção do *template* do MIP é necessário uma clivagem das ligações covalentes. Neste tipo de material, a aplicação se torna restrita, já que não há muitos monômeros funcionais que podem ser utilizados nas sínteses. (145) Neste método, o *template* pode ser impresso através de ligações covalentes reversíveis com derivados de ácido borônico formando ésteres de ácido borônico (Figura 4.4A), ligações com aldeídos formando bases de Schiff (Figura 4.4B), ou ligações de álcool com cetonas/aldeídos formando cetais/acetais (Figura 4.4C). (141, 146-148)

Figura 4.3 - Representação das estratégias de impressão covalente e não-covalente.

Fonte: Adaptado de (149).

Figura 4.4 – Representação de sítios seletivos de MIP baseado em ligação covalente reversível com derivado do ácido borônico (A), aldeídos (B) e alcoóis (C).

Fonte: Adaptado de (141, 147, 148).

A segunda estratégia de preparo envolve as interações não-covalentes entre os monômeros e o *template*. Essas interações podem ser do tipo iônica, hidrofóbica ou ligações de hidrogênio. Este método de preparo do MIP tem sido o mais utilizado devido a incorporação e a remoção do *template* do polímero não envolver a formação e quebra de ligação química, além de haver uma grande variedade de monômeros funcionais que podem ser utilizados como sítios seletivos na interação com as moléculas de interesse. Entretanto, esse método possui menor seletividade, pois ocorre um equilíbrio durante a interação do monômero com o *template* no processo de síntese. Assim, é necessário utilizar um excesso de monômero para garantir a formação do complexo e este fator leva a formação de sítios não seletivos no MIP causado pela presença de monômeros funcionais livres. (145)

No método de impressão com interações não-covalentes, as matrizes poliméricas podem ser classificadas em orgânicas, inorgânicas ou híbridas. Grande parte dos trabalhos relacionados com MIP utilizam matrizes orgânicas. Nesta rota sintética, normalmente são utilizados monômeros ácidos (ácido acrílico, ácido metacrílico e ácido p-vinilbenzóico) ou monômeros básicos (vinilpiridina, vinilimidazol e acrilamida) para interagir com a molécula do *template*, monômeros de agentes de ligação cruzada (etilenoglicol dimetacrilato, p-divinilbenzeno, n,n-metileno bisacrilamida) para dar rigidez a estrutura do polímero, um solvente (ACN, THF, tolueno, clorofórmio) para dissolver o *template* e os precursores do polímero, e também um iniciador radicalar de polimerização (2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN)) que é ativado por radiação UV ou aquecimento (Figura 4.5). (45, 145)

A propriedade de reconhecimento molecular do MIP é diretamente influenciada pelo solvente utilizado no processo sintético. Assim, para o bom desempenho do MIP, é necessário utilizar solventes similares ao empregado na síntese. Portanto, MIPs preparados em meio não aquoso podem possuir reconhecimento molecular fraco quando aplicado em matrizes aquosas como, por exemplo, amostras ambientais ou fluídos biológicos. (150)

Uma alternativa para esta problemática é a utilização da tecnologia sol-gel na preparação do MIP. (151, 152) Neste processo, os materiais sol-gel molecularmente impressos (*molecular imprinted sol-gel materials*, MISGMs) incorporam a molécula do *template* na estrutura rígida inorgânica ou híbrida (inorgânica-orgânica) do polímero. Os materiais inorgânicos normalmente são baseados em sílica, zircônia, titânia ou alumina. (153) Os precursores mais utilizados nesse processo sol-gel são baseados em sílica, utilizando como material de partida alcóxidos de silício como, por exemplo, o tetrametilortosilicato (TMOS) ou tetraetilortosilicato (TEOS). No preparo do MIP, a primeira etapa é a hidrólise do

Figura 4.5 – Reagentes tipicamente usados na síntese dos MIPs baseados por interações não-covalente utilizando precursores orgânicos.

Monômero funcional

Ácido acrílico

Ácido metacrílico

Ácido p-vinilbenzóico

4-vinilpiridina

2-vinilpiridina

4-vinilimidazol

Acrilamida

Agente de ligação cruzada

Etenoglicol dimetacrilato

p-divinilbenzeno

n,n'- metileno bisacrilamida

Iniciador radicalar

2,2'-azobisisobutironitrila

Azobisdimetilvaleronitrila

Peróxido de benzoíla

precursor levando a formação de moléculas com grupos silanois. Em seguida, inicia a reação de condensação dos grupos silanois e a formação da rede polimérica de sílica. A reação de hidrólise é catalisada por ácido ou base, e a reação de condensação ocorre simultaneamente com a hidrólise (Figura 4.6). (154)

Nos polímeros híbridos, o material é formado por uma estrutura orgânica-inorgânica. as propriedades estruturais dos polímeros podem ser usadas para distinguir e classificar os

Figura 4.6 – Representação esquemática da síntese do MIP pelo processo sol-gel.

Fonte: Adaptado de (155).

materiais híbridos. Quando a estrutura final da rede inorgânica é modificada com um grupo orgânico sem fornecer grupos funcionais capazes de sofrer reações químicas adicionais, o precursor é classificado como modificador de rede polimérica (Figura 4.7A). Entretanto, se um grupo funcional reativo é incorporado na rede polimérica, o precursor se torna funcionalizador de rede (Figura 4.7C). A situação é diferente quando grupos orgânicos são ancorados na rede polimérica (precursor construtor de rede). Neste caso, a parte orgânica integra e se torna parte da rede híbrida do material (Figura 4.7B). (77)

No preparo de materiais híbridos pode ser utilizada a rota sol-gel no qual precursor trialcoxissilano contendo o grupamento orgânico é incorporado na rede polimérica. Os principais precursores neste processo estão representados na Figura 4.8. Outra estratégia também utilizada no preparo de materiais híbridos é a combinação de monômeros orgânicos com os precursores do processo sol-gel (Figura 4.9). (77, 154)

Figura 4.7 - Esquema da hidrólise e condensação no processo sol-gel.**A – Modificador da rede polimérica** **B – Construtor da rede polimérica** **C – Funcionalizador da rede polimérica**

Fonte: Adaptado de (77).

Figura 4.8 - Precursores trialcóxissilanos frequentemente usados no processo sol-gel.

Figura 4.9 - Monômeros orgânicos aplicados na formação de materiais híbridos sol-gel/orgânico.

As Figuras 4.10 e 4.11 ilustram o esquema geral de síntese de MIP híbrido baseado em precursor trialcoxissilano (aminofuncionalizado) e a combinação do processo sol-gel com monômeros orgânicos.

Figura 4.10 – Representação esquemática da síntese de MIP amino funcionalizado.

Fonte: Adaptado de (156).

Figura 4.11 – Representação esquemática da síntese de MIP híbrido (orgânico-inorgânico).

Fonte: Adaptado de (157).

Os materiais híbridos tem a vantagem de acumular características tanto dos polímeros orgânicos como dos polímeros inorgânicos, além de possuir maior compatibilidade com uma ampla faixa de solventes. (77)

Apesar dos MIPs serem fáceis de preparar, uma das desvantagens desse material está relacionada com a remoção do *template* da matriz polimérica após a síntese. Na literatura, diversas metodologias de extração do *template* têm sido empregadas; contudo, em alguns casos, não se consegue a total remoção desses compostos do polímero. Assim, para superar este problema, muitos trabalhos utilizam estruturas análogas às moléculas de interesse para ser utilizada como *template* no preparo do MIP. (158)

MIP pode ser sintetizado por diversas metodologias. Os principais métodos sintéticos são a polimerização em massa (*bulk polymerization*), polimerização por suspensão (*suspension polymerization*), polimerização por enxerto (*seed polymerization*) e polimerização por precipitação (*precipitation polymerization*). (45, 158) Partículas esféricas ou irregulares são obtidas de acordo com o método escolhido no preparo do MIP. Pelos métodos tradicionais de preparação dos MIPs (polimerização em massa), os materiais possuem alta seletividade e afinidade com o *template*, entretanto possuem baixa acessibilidade das cavidades contendo os sítios seletivos. Assim, a cinética do processo de adsorção/dessorção é desfavorecida e a transferência de massa torna-se lenta. Uma solução promissora é a utilização da impressão molecular na superfície de um suporte. Desta maneira, o MIP com sítios seletivos na superfície do material melhora a cinética do processo de adsorção/dessorção e a transferência de massas sem perder a seletividade do processo de extração. (156, 159-161)

4.1.2 Aplicações dos polímeros molecularmente impressos em preparo de amostra

Os MIPs vêm sendo utilizados como fase extratora seletiva de diversas técnicas de preparo de amostra (SPE, SPME, SBSE, MEPS) em diferentes campos de aplicação (ambiental, biológica, alimentos, farmacêutica e herbal). (42, 158, 162, 163)

Entre os métodos de preparo de amostra, a aplicação de MIP em SPE, denominada extração em fase sólida com polímero impresso (*molecularly imprinted solid phase extraction* - MISPE), tem sido amplamente utilizada como meio de separação, *clean up* e pré-concentração seletiva de analitos em diferentes amostras. MISPE tem demonstrado extrações mais seletivas quando comparada com fases extratoras convencionais (baseadas em sílica e poliméricas). (164, 165) Além disso, a facilidade de preparo, baixo custo, robustez química e física, resistência a alta pressão e temperatura são algumas vantagens que tornam o MIP um sorvente mais atrativo que os sorventes baseados em imunoafinidade - no qual é difícil a obtenção de anticorpos, demanda de longo tempo de preparo, é um processo caro e ainda possui problemas de estabilidade.

MISPE no modo *off-line* é o método mais comum e empregado para a extração seletiva dos analitos. Entretanto, como já discutido no capítulo 1, o protocolo *online* promove a automação do processo de extração, separação e detecção apenas conectando a coluna de extração e separação com válvulas de comutação (sistema bidimensional). Aplicações de MISPE-LC *online* têm sido demonstradas em matrizes ambientais (água de rio, lago, subterrânea, residuária e solo) (43, 165-170), biológicas (urina, plasma, e cultura de células)

(171-175) e alimentícia (frutas, bebidas e carnes) (176-182). A Tabela 4.1 relata os trabalhos publicados abordando o acoplamento *online* entre o MISPE e a LC. O primeiro trabalho empregando esta característica foi publicado em 1999 (164) e até agosto de 2012, aproximadamente 54 artigos foram publicados.

4.1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) são um grupo de compostos muito usados para o tratamento da dor, inflamação, febre e doenças reumáticas. (183) Além disso, estudos recentes vêm sendo conduzidos com esses compostos na quimioprevenção do câncer. (184)

Os NSAIDs estudados neste trabalho foram o cetoprofeno (CET), ibuprofeno (IBU), fenoprofeno (FEN), flurbiprofeno (FLU) e o naproxeno (NAP) que são fármacos derivados do ácido arilpropiónico (Figura 4.12).

A ação desses fármacos ocorre através do bloqueio da enzima cicloxigenase (Cox-1 e Cox-2) que são responsáveis pela produção das prostaglandinas (PGs). (185) As PGs possuem diversas funções no organismo e uma delas está relacionada com a sensibilidade das vias de transmissão de dor. Entretanto, as PGs também são responsáveis no processo de proteção do estômago e coagulação do sangue. Assim, o uso dos NSAIDs pode provocar úlceras no estômago, e até promover sangramento prolongado após ferimento ou cirurgia devido a demora na coagulação sanguínea. Além disso, em alguns casos eles estão associados com

Figura 4.12 - Estrutura química dos NSAIDs estudados.

Tabela 4.1 – Métodos de MISPE-LC *online*.

<i>Template</i>	Extração	Matriz	Online MISPE	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref
Análise Ambiental								
Simazina	Triazinas	Água com ácido húmico	55 mm x 2,0 mm C18 150 mm 4,6 mm MIP	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA	1999	(164)
4-nitrofenol	4-nitrofenol	Água de rio	10 mm x 3,0 mm	250 mm 4,0 mm 5 µm C18	LC-UV	4-PV/EDMA	2000	(186)
Terbutilazina	Triazinas	Água de rio	25 mm x 4,0 mm RAM 25 mm x 4,6 mm MIP	5,0 mm x 250 mm 5µm C18	LC-MS	MAA/EDMA LD = 20 – 50 ngL ⁻¹	2001	(187)
4-nitrofenol	4-nitrofenol	Água de rio	10 mm x 3,0 mm	250 mm x 4,0 mm 5 µm C18	LC-UV	4-PV/EDMA	2002	(188)
4-clorofenol	4-clorofenóis, 4-nitrofenol	Água de rio	10 mm x 3,0 mm	250 mm x 4,0 mm 5µm C18	LC-UV	4-PV/EDMA MAA/EDMA	2003	(189)
p-t-butilfenol ou bisfenol A	Bisfenol A	Água de rio	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-FLD	4-PV/EDMA LD = 25 ng L ⁻¹	2003	(190)
p-t-butilfenol	Bisfenol A	Água de lago	30 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-ECD	4-PV/EDMA LD = 0,36 ng L ⁻¹	2004	(191)
p-t-butilfenol	Bisfenol A	Água de rio	50 mm x 4,0 mm	4,6mm x 150mm C18	LC-ECD LC-UV	4-PV/EDMA LD = 0,36 ng L ⁻¹	2004	(192)
4,4'-metilenobisfenol	Bisfenol A	Água de rio	NR	150 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	4-PV/EDMA RAM-MIP	2004	(193)
Pentaclorofenol	Pentaclorofenol	Esgoto, água de rio e lago	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm 5µm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 6 ng L ⁻¹	2005	(159)

<i>Template</i>	Extração	Matriz	<i>Online MISPE</i>	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref.
4,4'-metilenobisfenol	Bisfenol A	Água de rio	30 mm x 4,6 mm	150 mm x 2,1 mm C18	LC-MS LC-DAD	4-PV/EDMA RAM-MIP LD = 0,45 ng L ⁻¹	2005	(194)
4,4'-metilenobisfenol e p-t-butilfenol	Bisfenol A	Água de rio	30 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-ECD LC-UV	4-PV/EDMA RAM-MIP LD = 0,36 ng L ⁻¹	2005	(195)
4,4'-metilenobisfenol	Bisfenol A	Água de rio	30 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	4-PV/EDMA RAM-MIP	2005	(196)
Bisfenol A	Compostos fenólicos	Água de rio	50 mm x 4,0 mm	200 mm x 4,6 mm 5µm C18 50 mm x 4,6 mm C18 monolítica	LC-UV	4-PV/EDMA MIP monolítico LD = 60 ng L ⁻¹	2006	(197)
6-Cetoeceadiol	17β-estradiol	Água de rio	30 mm x 4,6 mm	150 mm x 2,1 mm C18	LC-MS	4-PV/EDMA RAM-MIP LD = 1,8 ng L ⁻¹	2006	(44)
Irgarol	Metiltiotriazina	Água de rio	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,0 mm C18	LC-MS	TFMAA/EDMA RAM-MIP LD = 25 ng L ⁻¹	2007	(198)
Tiabendazol	Benzimidazóis	Água de rio e torneira	50 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA MAA/DVB LD = 30 – 90 ng L ⁻¹	2009	(166)
Ciclobarbitol	Antiepilépticos	Água de rio	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 2,0 mm C18	LC-MS	4-PV/EDMA RAM-MIP LD = 0,5 – 5 ng L ⁻¹	2009	(167)
Estrona	Estrona	Água de lago	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 5,7 ng L ⁻¹	2009	(43)
Tiabendazol	Benzimidazóis	Água de rio e torneira	50 mm x 4,6 mm	C18	LC-UV	MAA/DVB LD = 2,3 – 5,7 ng L ⁻¹	2009	(199)
Metribuzina	Metribuzina	Solo de plantação de milho	15 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	MAA/EDMA MIP monolítico LD = 0,83 µg kg ⁻¹	2009	(168)

<i>Template</i>	Extração	Matriz	<i>Online MISPE</i>	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref
MIP comercial	Triazinas	Solo e água de torneira	Sorvente polimérico + MIP	150 mm x 4,6 mm 3,5 µm C18	LC-UV	micro-SPE multimodal	2010	(165)
Sudan I	Sudan I - IV	Água de rio	NR	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	2-VP/EDMA LD = 10 – 50 ng L ⁻¹	2010	(176)
Clorsulfuron	Clorsulfuron	Água de superfície	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	Líquido iônico vinilimidazol/EDMA LD = 1 ng L ⁻¹	2011	(169)
Bisfenol A	Bisfenol A	Água de rio	30 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-FLD	EDMA RAM-MIP LD = 90 µg L ⁻¹	2011	(170)
Análise de fluidos biológicos								
Simazina	Triazinas	Urina	55 mm x 2,0 mm C18 150 mm x 4,6 mm MIP	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA	1999	(164)
Naproxeno	Ibuprofeno	Plasma de rato	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	4-VP/EDMA RAM-MIP LD = 50 µg L ⁻¹	2000	(200)
Tramadol	Tramadol	Plasma humano	25 mm x 4,0 mm RAM 25 mm x 4,6 mm MIP	125 mm x 4,0 mm 5 µm CN	LC-FLD	MAA/EDMA	2001	(201)
Propranolol	β-bloqueadores	Plasma de rato	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 6,0 mm 5 µm ES-PhCD	LC-FLD	MAA/EDMA RAM-MIP LD = 12,5 µg L ⁻¹	2003	(202)
Verapamil	Verapamil e metabólitos	Cultura de células, urina e plasma	25 mm x 4,0 mm RAM 40 mm x 4,0 mm MIP	125 mm x 4,0 mm 5 µm C18	LC-MS	MAA/EDMA LD = 5 µg mL ⁻¹	2004	(171)

<i>Template</i>	Extração	Matriz	Online MISPE	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref
Cafeína	Cafeína	Urina	Cartucho de polipropileno	250 mm x 4,6 mm	LC-UV	MAA/EDMA	2004	(177)
Carbaril	Carbaril e 1-naftol	Plasma de rato	50 mm x 4,6 mm	50 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA LD = 1 µg L ⁻¹	2006	(203)
Bupivacaína	Ropivacaína, bupivacaína	Plasma humano	20 mm x 2,0 mm	50 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA/HEMA LD = 2,5 – 5 µmol L ⁻¹	2007	(204)
Alfuzosina	Alfuzosina	Plasma	20 mm x 2,0 mm	150 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA LQ = 15 µg L ⁻¹	2008	(205)
Norfloxacina	Enrofloxacin, ciprofloxacina	Urina	15 mm x 3,2 mm	4,6mm x 250mm 5 µm C18	LC-UV	HEMA/EDMA MIP monolítico LD = 10 – 12 µg L ⁻¹	2009	(173)
Dextrometorfano	Dextrometorfano	Plasma humano	Cartucho polipropileno	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-DAD	MAA/EDMA LD = 0,12 µg L ⁻¹	2011	(174)
MIP comercial	NNAL	Urina	19 mm x 0,5 mm	100 mm x 2 mm 5 µm C18	LC-MS	LQ = 20 ng L ⁻¹	2011	(175)
Análise de alimentos								
Simazina	Triazinas	Maça	55 mm x 2,0 mm C18 150 mm 4,6 mm MIP	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA	1999	(164)
Cafeína	Cafeína	Café e bebidas	Cartucho polipropileno	250 mm x 4,6 mm	LC-UV	MAA/EDMA	2004	(177)
Carbaril	Carbaril e 1-naftol	Maça	50 mm x 4,6 mm	50 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA LD = 1 µg L ⁻¹	2006	(206)

<i>Template</i>	Extração	Matriz	Online MISPE	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref
Ocratoxina A	Ocratoxin A	Vinho tinto	Frit 0,5 μ m 0,094" i.d. x 0,250" o.d. x 0,062" comprimento	250 mm x 4,6 mm 5 μ m C18	LC-FLD	Pirrol/nanotubos de carbono LD = 12 ng L ⁻¹	2006	(178)
Sudan I	Sudan I	Pimenta	15 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 1,2 ng L ⁻¹	2007	(207)
Sulfametazina	Sulfonamidas	Músculo de porco e frango	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm 5 μ m C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 4,6 - 7,3 ng L ⁻¹	2008	(208)
Ractopamina	Ractopamina	Carne de porco	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm C18	LC-FLD	APTES/TEOS LD = 4,5 ng L ⁻¹	2009	(209)
Enrofloxacina	Enrofloxacina	Carne de peixe e frango	15 mm x 4,0 mm	250 mm 4,6 mm C18	LC-FLD	APTES/TEOS LD = 8 ng L ⁻¹	2009	(179)
Tetraciclina	Tetraciclins	Leite e mel	100 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm 5 μ m C18	LC-UV	MAA/EDMA MIP monolítico LD = 10,2 - 18,8 μ g L ⁻¹	2009	(210)
Oxitetraciclina e clortetraciclina	Tetraciclins	Lagosta, leite e mel	10 mm x 4,6 mm	150 mm x 2,1 mm 5 μ m C18	LC-UV	MAA/TRIM	2010	(181)
Sulfametazina	Sulfonamidas	Leite bovino	40 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,6 mm 5 μ m C18	LC-UV	MAA/EDMA RAM-MIP LD = 0,2 - 0,8 μ g L ⁻¹	2010	(211)
Para-red	Para-red	Molho de tomate	15 mm x 4,0 mm	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 6,6 ng L ⁻¹	2010	(212)
Sudan I	Sudan I - IV	Tomate, molho de tomate e salsicha	NR	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	2-VP/EDMA LD = 10 - 50 ng L ⁻¹	2010	(176)

<i>Template</i>	Extração	Matriz	<i>Online MISPE</i>	Método de separação	Deteção	Observações	Ano	Ref
Sudan IV	Sudan IV	Pimenta	15 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 2,3 ng L ⁻¹	2010	(213)
Ácido 3-metil- quinoxalina-2- carboxílico	1,4-dioxido- quinoxalina-	Músculo de porco	15 mm x 4,0 mm	250mm x 4,6 mm C18	LC-UV	APTES/TEOS LD = 20 – 40 ng kg ⁻¹	2011	(214)
Oxitetraciclina e clortetraciclina	Tetraciclinas	Ovo	10 mm x 4,6 mm	150 mm x 2,1 mm 5 µm C18	LC-DAD	MAA/TRIM LD = 0,8 – 1,3 µg kg ⁻¹	2011	(180)
2,4-diamino-6- undecil- 1,3,5-triazina	Ciromazina e melamina	Leite	50 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm 5µm C18	LC-UV	MAA/EDMA MIP monolítico LD = 50 – 120 µg L ⁻¹	2011	(215)
β-naftol	Estrogênios	Leite	NR	250 mm x 4,6 mm C18	LC-UV	CyD/MBAA LD = 1 – 8 µg kg ⁻¹	2012	(182)
Análise farmacêutica e herbal								
Atropina	Atropina e escopolamina	Medicamento gastrointestina l	10 mm x 4,0 mm	150 mm x 4,6 mm SCX	LC-UV	TFMAA/EDMA LD = 1 – 8 µg L ⁻¹	2005	(172)
l-tetraidropalmatina	dl-tetraidropal matina	Raiz da <i>Corydalis yanhusuo</i>	50 mm x 4 mm	200 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	MAA/EDMA MIP monolítico	2006	(216)
<i>trans</i> -resveratrol	<i>trans</i> - resveratrol e emodina	Raiz da <i>Polygonum cuspidatum</i>	150 mm x 4,6 mm	150 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-UV	4-VP/EDMA LD = 10 µg L ⁻¹	2008	(217)
Propil galato	Ácido protocatecuico	Extrato da <i>Radix Salviae Miltiorrhizae</i>	50 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,6 mm 5 µm C18	LC-MS	4-VP/EDMA	2012	(218)

insuficiência renal, sonolência, tontura, náusea, diarreia e falta de apetite. Esses compostos também diminuem a ação de compostos diuréticos e atuam na inibição de fármacos utilizados no tratamento da hipertensão. (219, 220) Assim, é importante o desenvolvimento de métodos de monitoramento desses compostos em fluidos biológicos.

A determinação desses compostos em fluidos biológicos pode ser realizada pela coleta de sangue ou de urina. A escolha pela via urinária para a determinação desses fármacos na rotina laboratorial é vantajosa, visto que é um método de coleta não invasivo quando comparada com a via sanguínea. Na urina, os NSAIDs são excretados na forma inalterada, metabolizada (oxidada) e conjugada com o ácido glucurônico. Na literatura, existem diversos métodos propostos para a determinação dos NSAIDs em matriz biológica com fases extratoras tradicionais. (219, 221-223) Alguns trabalhos também foram publicados utilizando a tecnologia de impressão molecular nessas determinações; entretanto, grande parte dos artigos realiza a determinação de apenas um composto de interesse. (200, 224-228) Além disso, a maioria dos métodos bioanalíticos desenvolvidos utilizam muitas etapas de extração, e isto torna o método muito trabalhoso, com diversas fontes de erro e contaminação, além de prolongar o tempo total de análise. Assim, os métodos *online* são uma opção vantajosa por minimizar essas desvantagens. Uma busca na literatura revelou que apenas um trabalho foi publicado utilizando MISPE-LC *online* na determinação de NSAIDs. Adicionalmente, o trabalho relata a síntese do MIP empregando monômeros orgânicos e utilizando o naproxeno como *template* para a análise de ibuprofeno em plasma de rato. (200)

4.2 Objetivos

Primeiramente o objetivo deste trabalho foi sintetizar um polímero amino-funcionalizado seletivo para a extração de cinco NSAIDs. Em seguida o objetivo foi desenvolver um método de análise automatizado, simples e rápido através do sistema *online* utilizando *column switching* para analisar amostras de urina com o mínimo de preparo de amostra. Por fim, o método foi validado e aplicado em amostras reais de urina.

4.3 Experimental

4.3.1 Reagentes

Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) com 63-200 μm foi utilizada como suporte de polimerização do MIP. Para a síntese do polímero foram utilizados trietoxissilano (TEOS), aminopropiltrietoxissilano (APTES) da Aldrich (Steinheim, Alemanha) e etiltrietoxissilano (ETEOS) da Gelest (Morrisville, EUA). Ácido acético glacial (Mallinckrodt, Xalostoc, México), acetonitrila e metanol, ambos da Tedia (Fairfield, EUA) foram usados no trabalho. A água ultrapura foi fornecida pelo sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA).

Os padrões analíticos de ibuprofeno (IBU), fenoprofeno (FEN), naproxeno (NAP), cetoprofeno (CET), flurbiprofeno (FLU), fluoxetina e norfluoxetina foram adquiridos da Sigma (Steinheim, Alemanha). A cafeína proveniente da Alfa Aesar (Heysham, Reino Unido) e o ácido acetilsalicílico da Synth (Diadema, Brasil).

4.3.2 Síntese do MIP

Primeiramente, 5 g de sílica gel foram ativadas por refluxo com 60 mL de HCl 5 mol L^{-1} por 12 h; posteriormente, a sílica ativada foi filtrada, lavada com água ultrapura e secada em estufa a 120°C por 24 h.

Para preparar o MIP de ibuprofeno, 300 mg de ibuprofeno foram dissolvidos em 5 mL de metanol, sendo adicionados 2 mL de APTES e 30 μL de ETEOS a mistura. A solução foi agitada magneticamente e refluxada por 20 minutos. Depois, 4 mL de TEOS foram adicionados, permanecendo a agitação por 10 minutos. Por fim, 1 g de sílica ativada e 1 mL de ácido acético 1 mol L^{-1} foram adicionados a mistura. A reação permaneceu a temperatura ambiente por 24 h.

O produto foi lavado com metanol para remover resíduos dos reagentes e secado em estufa a 100°C por 12 h. O MIP foi triturado e o *template* removido por refluxo em soxhlet utilizando metanol contendo 5 % de ácido acético por aproximadamente 200 ciclos de extração. O polímero controle (NIP) foi sintetizado conforme procedimento anterior, porém sem a adição do ibuprofeno.

4.3.3 Caracterização do MIP

A morfologia das partículas do MIP foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss-Leica/440) operando a 20 kV e as amostras foram recobertas com

uma fina camada de ouro. A área superficial e o diâmetro do poro foram medidos pela isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77K (Quantachrome Instruments) pelo método Braunaer-Emmett-Teller (BET). Os espectros de infravermelho (FT-IR) foram obtidos de 4000 a 400 cm^{-1} no equipamento Bomem MB-102 empregando disco de KBr para preparar as amostras.

4.3.4 Preparo da coluna MIP

As partículas do MIP foram empacotadas em tudo de aço inoxidável com 4,6 mm de diâmetro interno e 20 mm de comprimento utilizando *frit* de 2 μm . O empacotamento foi realizado empregando uma bomba LC-20AD e metanol como solvente propulsor.

4.3.5 Método cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida *online* com *column switching* consistiu de um HPLC série Prominence 20A da Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema consistiu de três bombas LC-20AD, um amostrador automático SIL-20A, um forno cromatográfico CTO-20A, um detector UV SPD-20A e uma controladora CBM-20A. As bombas, o amostrador e o detector foram acoplados a uma válvula seletora de seis vias e duas posições. O software LC-Solution (Shimadzu) controlou os módulos do sistema cromatográfico e também a válvula seletora.

Neste trabalho foi empregada uma coluna MIP para extração (4,6 mm x 20 mm) e uma coluna analítica NST C18 (2,1 mm x 150 mm x 5 μm) para realizar a análise *online* dos analitos. A Figura 4.13 detalha as colunas cromatográficas conectadas a válvula seletora dentro do forno cromatográfico. A extração *online* foi avaliada no modo de injeção *foreflush* e *backflush*. No modo *foreflush* a eluição dos analitos acontece no mesmo sentido da vazão de extração (Figura 4.14). Já no modo *blackflush* a eluição acontece em sentido contrário à vazão de extração (Figura 4.15). A bomba A operou como bomba analítica com vazão de 0,2 mL min^{-1} utilizando MeOH: H₂O (70:30) 0,2 % de ácido acético como fase móvel em modo isocrático. A temperatura do forno foi mantida a 35°C e o comprimento de onda monitorado durante os experimentos pelo detector de UV foi de 220 nm. Já as bombas B e C operaram como bombas do processo de extração. A bomba B possuía H₂O 0,05 % de ácido acético e a

Figura 4.13 - Fotografia do sistema *online*. A) Vista completa do arranjo *online* dentro do forno cromatográfico e B) ampliação da válvula de seis vias e da coluna de extração.

Figura 4.14 - Configuração do sistema *online* para eluição no modo *foreflush*.

Figura 4.15 - Configuração do sistema *online* para eluição no modo *backflush*.

bomba C, MeOH 0,5 % de ácido acético. O volume injetado pelo amostrador automático foi de 5 μL . A Tabela 4.2 apresenta a sequencia de eventos otimizados na análise *online*.

4.3.6 Preparo das soluções padrões para a validação

Soluções estoque de CET, NAP, FLU, IBU e FEN (PI) foram preparadas em MeOH na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Soluções de trabalho de CET, NAP, FLU e IBU a 250 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e FEN a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas a partir das soluções estoque. Essas soluções foram usadas para fortificar as amostras de urina usadas no processo de validação. As soluções estoque foram mantidas em freezer, e as soluções de trabalho sob refrigeração a 4°C.

Para atingir as concentrações desejadas, alíquotas da solução trabalho foram transferidas para frascos do tipo *ependorf*, secas sob fluxo de nitrogênio e ressuspensas em 1 mL de urina branco. As amostras foram homogenizadas no ultrassom por 5 minutos, diluídas com água ultrapura em igual volume (50:50, v/v), centrifugadas a 10955 g por 5 minutos e transferidas para frascos (*vials*) apropriados que foram levados ao amostrador automático do HPLC.

Tabela 4.2 - Eventos realizados durante as etapas de preparo de amostra e separação cromatográfica.

Tempo (min)	Evento
0,00	Válvula seletora na posição 1
0,00	Amostrador faz a injeção da amostra
0,00 – 23,00	Vazão Bomba A em 0,2 mL min ⁻¹
0,00 – 7,00	Vazão total das bombas B/C em 0,2 mL min ⁻¹ Solvente da bomba B = 100 %
5,00	Válvula seletora na posição 2
7,00	Válvula seletora na posição 1
8,00 – 17,00	Vazão total das bombas B/C em 1 mL min ⁻¹
9,00 – 12,00	Solvente da bomba C = 100 %
14,00 – 22,00	Solvente da bomba B = 100 %
18,00	Vazão total das bombas B/C em 0,2 mL min ⁻¹
22,00	Sistema finaliza a corrida cromatográfica

4.3.7 Validação do método

Os seguintes parâmetros foram avaliados na validação do método: seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-dias, recuperação, limite de detecção e quantificação, reprodutibilidade intralaboratorial, efeito matriz, interferentes, efeito da diluição da amostra e robustez. Na validação foram seguidas as recomendações da RE n° 899 da ANVISA. (116) Entretanto, alguns parâmetros não abordados mais profundamente nesta resolução, foram avaliados seguindo recomendações de outras agências. (117, 119)

Amostra de branco de urina foram coletadas de 7 indivíduos saudáveis, sendo então preparado um *pool* de urina o qual foi utilizado na validação da metodologia. A seletividade do método foi avaliada realizando a injeção em quintuplicada da urina sem adição do fármaco.

A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas construídas em quintuplicatas em seis níveis de concentração (0,5, 3, 6, 9, 12 e 15 µg mL⁻¹) totalizando um n = 30 para cada

fármaco analisado. O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo três vezes a amplitude do ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) como sendo no mínimo dez vezes a amplitude do ruído da linha de base.

A precisão intra-dia foi avaliada em quintuplicata em três níveis diferentes (baixo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), médio ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alto ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$)) em dois dias consecutivos, e a precisão inter-dia foi avaliada com os resultados dos dois dias de coleta dos dados. Os resultados destes ensaios foram expressos em desvio padrão relativo (DPR).

Similarmente ao ensaio de precisão, foi calculada a exatidão intra e inter-dia, nos mesmos níveis e os resultados foram apresentados em percentagem de desvio.

A reprodutibilidade intralaboratorial foi realizada em três níveis diferentes (baixo, médio e alto), sendo realizadas seis injeções para cada nível. O primeiro conjunto de amostras fortificadas foi realizado nas condições padrões do método. O segundo conjunto foi realizado por outro analista, e o terceiro conjunto alterando a temperatura da sala do equipamento. A seguir foram calculados os valores de precisão e exatidão do ensaio.

A eficiência da extração foi avaliada através da recuperação absoluta (níveis médio e alto) e da recuperação relativa (níveis baixo, médio e alto).

O efeito matriz do método foi avaliado realizando a injeção de seis amostras branca de urina fortificada no nível baixo e alto da curva analítica em sextuplicata de doadores individuais. Nesta etapa não se utilizou o *pool* de amostra branco de urina. Os resultados foram expressos em DPR e percentagem de desvio do valor real.

O efeito de memória (*carry over*) foi avaliado realizando a injeção do nível mais alto da curva cromatográfica ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$), e em seguida, a injeção do branco da urina.

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden usando um planejamento fatorial fracionário no qual é avaliada a influência de sete variáveis em dois níveis diferentes (Tabela 4.3). As letras maiúsculas representam os valores nominais ou padrão do método desenvolvido, e as letras minúsculas as variações a serem estudadas. Assim, neste teste são realizados oito experimentos de forma aleatória com a combinação fatorial dos parâmetros avaliados e verifica-se qual o efeito ou combinações de efeitos que influenciam no resultado final (Tabela 4.4).

Assim, foi avaliada a influência dos sete parâmetros em relação à concentração dos analitos, tempo de retenção, fator de retenção e fator de retenção relativo.

O ensaio para avaliar a influência de interferentes na análise foi realizado fortificando urina com cafeína ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), nicotina ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$), ácido acetilsalicílico ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$), fluoxetina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e norfluoxetina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 4.3 - Fatores avaliados na robustez do método.

Efeito	Condição Nominal		Variação	
Temperatura do forno (°C)	35	A	37	a
Vazão da bomba analítica (mL min ⁻¹)	0,20	B	0,18	b
Proporção de MeOH na fase móvel (%)	70	C	67	c
Ácido acético na fase móvel (%)	0,20	D	0,25	d
Vazão da bomba de extração (mL min ⁻¹)	0,20	E	0,15	e
Comprimento de onda do detector (nm)	220	F	222	f
Ácido acético na água de carregamento (%)	0,05	G	0,10	g

Tabela 4.4 - Matriz de Youden.

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
A/a	35	35	35	35	37	37	37	37
B/b	0,20	0,20	0,18	0,18	0,20	0,20	0,18	0,18
C/c	70	67	70	67	70	67	70	67
D/d	0,20	0,20	0,25	0,25	0,25	0,25	0,20	0,20
E/e	0,20	0,15	0,20	0,15	0,15	0,20	0,15	0,20
F/f	220	222	222	220	220	222	222	220
G/g	0,05	0,10	0,10	0,05	0,10	0,05	0,05	0,10
RESULTADO	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

O estudo da estabilidade dos fármacos reproduziu as condições reais de manuseio e análise das amostras. Foi avaliada a estabilidade dos analitos nas soluções estoque e intermediária, após ciclos de congelamento e descongelamento, em armazenagem de curta duração (temperatura ambiente) e longa duração (congelamento), e também no pós-processamento das amostras. As determinações foram realizadas fortificando a urina isenta dos analitos nos níveis baixo e alto da curva analítica. Foram utilizadas três amostras para cada nível e as análises foram feitas em duplicatas.

4.3.8 Determinação dos fármacos em amostras de urina

Após o método ter sido validado, foi aplicado em amostras de urina de voluntários saudáveis que administraram uma única dose oral de comprimidos contendo cetoprofeno 100 mg, naproxeno 250 mg e ibuprofeno 200 mg. As amostras de urina dos voluntários foram coletadas em três períodos de tempo (2-4 h, 6-8h e 10-12h) e, posteriormente, armazenadas em geladeira a 4°C. Para a quantificação dos fármacos na forma livre em urina, foi realizada a adição do padrão interno seguida da análise pelo método desenvolvido e validado.

A determinação dos NSAIDs na forma desconjugada (acil-glucoronídeo) foi realizada pela adição 100 µL de NaOH 1,0 M em 500 µL de urina contendo o padrão interno em tubo de 1,5 mL. A solução ficou em temperatura ambiente por 1,5 h para a hidrólise dos fármacos. Posteriormente, a urina hidrolisada foi neutralizada com 100 µL de HCl 1,0 M e o volume foi completado para 1 mL seguida da análise pelo método desenvolvido e validado.

Amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas para avaliar o desempenho do método e a validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas. Foram preparadas quatro amostras de CQ: CQ do limite inferior (CQ-LIQ (0,5 µg mL⁻¹)), CQ de baixa concentração (CQB (1,5 µg mL⁻¹)), CQ de média concentração (CQM (6 µg mL⁻¹)) e CQ de alta concentração (CQA (12 µg mL⁻¹)). Os CQs foram intercalados com a análise de amostras.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Preparo e caracterização do MIP

A Figura 4.16 representa o esquema reacional sugerido para o preparo do MIP. Após a mistura dos precursores poliméricos com o *template* (ibuprofeno) ocorre a formação de um complexo polímero-*template*. Após a reação de hidrólise e condensação catalisada por ácido há a formação da rede polimérica de sílica amino-funcionalizada na superfície das partículas de sílica gel. Os grupamentos amino e silanol estão fixados na estrutura do polímero e interagem com o *template*. Após a remoção do *template* por soxhlet, há a formação de uma cavidade que possui sítios seletivos para o ibuprofeno e estruturas análogas a ele.

Na Figura 4.17 temos imagens da MEV das partículas de sílica gel e do MIP sintetizado. Podemos observar que antes do preparo do MIP as partículas de sílica apresentam

superfície lisa e, após o recobrimento destas partículas com o MIP, elas se apresentaram rugosas. Pelo método BET, as partículas do MIP apresentaram área superficial de $64 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e um diâmetro médio dos poros de 2,6 nm, enquanto o material usado como suporte cromatográfico apresentou área superficial de $550 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e diâmetro médio dos poros de 6 nm de acordo com especificações do fabricante.

Figura 4.16 - Esquema sugerido para a preparação do MIP.

Figura 4.17 - Imagem de MEV da superfície da sílica ativada (A) e do MIP sintetizado (B).

Os polímeros sintetizados também foram caracterizados por análise na região do infravermelho. Para confirmar a presença dos modificadores na superfície da sílica, os espectros da sílica ativada, MIP e NIP estão na Figura 4.18. Podemos observar que as bandas em 1103 cm^{-1} e 935 cm^{-1} são atribuídas às vibrações Si-O-Si e Si-O-H, respectivamente. Já as bandas presentes em 796 cm^{-1} e 470 cm^{-1} são referentes às vibrações Si-O. As vibrações das hidroxilas presentes na estrutura da sílica (O-H) apresentam bandas na região de 3433 cm^{-1} e 1627 cm^{-1} . Todas essas bandas apresentadas são características da estrutura polimérica da sílica e estão presentes na sílica gel, MIP e NIP.

A confirmação da polimerização do APTES e ETEOS na superfície da sílica gel é a presença de bandas atribuídas às vibrações da ligação N-H em 3357 cm^{-1} e 1598 cm^{-1} e também a presença de ligações C-H com bandas em 2933 cm^{-1} nos sorbentes MIP e NIP. As bandas dessas vibrações nos dois materiais apresentaram localização e intensidades similares.

Assim, estes resultados sugerem que os grupos modificadores da sílica foram polimerizados e ancorados na superfície da sílica ativada após a síntese do MIP do ibuprofeno.

4.4.2 Separação cromatográfica

Primeiramente foi realizada a otimização da separação cromatográfica dos cinco NSAIDs. Nesta etapa utilizou-se LC-UV no modo unidimensional, com a coluna em fase reversa C18, sendo a temperatura do forno mantida a 35°C , o volume injetado do padrão ($1,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) foi de $10\text{ }\mu\text{L}$, a vazão da fase móvel foi de $0,2\text{ mL min}^{-1}$ e o comprimento de onda monitorado foi de 220 nm . Nestas condições foi avaliado qual o solvente orgânico a ser utilizado na fase móvel. Na Figura 4.19 temos os cromatogramas da separação dos compostos utilizando ACN e MeOH na fase móvel. Ao utilizar ACN, observamos que o cetoprofeno e o naproxeno coeluem, ou seja, nesta condição de análise não há seletividade entre esses dois compostos e o fator de separação (α) é igual a 1,00. Provavelmente o uso de uma percentagem baixa de ACN na fase móvel na condição inicial e, posteriormente, um gradiente de solvente, promoveria uma melhor resolução entre esses dois compostos. Entretanto, isso aumentaria o custo de uma bomba adicional no sistema *online*. Além disso, a fase móvel inicial seria o solvente de eluição dos analitos da coluna de extração (MIP) e uma baixa percentagem do solvente orgânico poderia não eluir completamente os compostos, prejudicando o método.

Figura 4.18 - Espectro de Infravermelho da sílica gel, MIP e NIP. Bandas: (1) O-H, (2) N-H, (3) C-H, (4) O-H, (5) N-H, (6) Si-O-Si, (7) Si-OH, (8) Si-O e (9) Si-O.

Figura 4.19 - Cromatograma da separação dos fármacos utilizando acetonitrila e metanol como fase móvel. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5).

Assim, uma das maneiras de alterar o fator de separação para o cetoprofeno e o naproxeno foi trocando a ACN por MeOH na fase móvel. Utilizando MeOH:H₂O (70:30 v/v) com 0,2 % de ácido acético com fase móvel no modo isocrático, realizou-se a separação cromatográfica dos cinco compostos de interesse, podendo assim, realizar a quantificação de todos os analitos utilizando o detector UV.

Após a otimização da fase móvel, ainda no arranjo unidimensional, foi avaliado o tempo na qual a válvula seletora ficaria na posição de carregamento para que os interferentes presentes na urina fossem eliminados. A Figura 4.20 apresenta o cromatograma da injeção de 5 μL de urina na coluna MIP. Podemos observar que o tempo de cinco minutos foi suficiente para garantir a extração dos analitos e promover um *clean up* da amostra.

Após essa etapa, o HPLC foi rearranjado para o modo *online* por *column switching* e as condições de análise foram otimizadas conforme apresentado na Tabela 4.2. Como solvente de extração e *clean up* foi utilizado água ultrapura com 0,05 % de ácido acético, e para evitar efeito de memória, após a eluição dos analitos para a coluna analítica, foi realizada uma limpeza da coluna MIP com metanol 0,5 % de ácido acético.

Neste trabalho foi avaliada a possibilidade de realizar o modo *foreflush* e *backflush* de eluição. A Figura 4.21 mostra a comparação dos cromatogramas nos dois modos de eluição. Os dois modos apresentaram separação cromatográfica adequada para análise. No modo *foreflush*, os picos cromatográficos foram ligeiramente mais estreitos em relação ao modo *backflush*, contudo, o sinal cromatográfico foi maior no modo *backflush*.

Na continuidade do trabalho, o modo *backflush* foi escolhido para realizar as análises; a Tabela 4.5 apresenta os parâmetros cromatográficos para os NSAIDs nas condições otimizada de análise.

Figura 4.20 - Cromatograma da injeção direta da urina na coluna MIP no arranjo unidimensional.

Figura 4.21 - Cromatograma da urina fortificada com os fármacos no modo de injeção *foreflush* e *backflush*. Ordem de eluição: Cetoprofeno (1), Naproxeno (2), Fenoprofeno (3), Flurbiprofeno (4) e Ibuprofeno (5).

Tabela 4.5 - Parâmetros cromatográficos da separação.

Fármaco	t_R (min.)	k	k relativo*	R_s	α	TF	N/m	H (μm)	h
CET	10,81	2,63	0,54	-	-	1,54	44880	22,28	4,46
NAP	11,61	3,13	0,64	2,51	1,19	1,64	46320	21,59	4,32
FEN	14,41	4,88	1,00	6,99	1,55	1,42	54000	18,52	3,70
FLU	15,76	5,72	1,17	2,78	1,17	1,30	56613	17,66	3,53
IBU	19,87	8,29	1,70	6,89	1,44	1,23	59967	16,68	3,34

Tempo morto (t_m) = 1,6 minutos; * $k_{\text{relativo}} = k_{\text{fármaco}}/k_{\text{padrão interno}}$; k = fator de retenção; R_s = resolução; α = fator de separação; TF = fator de alargamento; N/m = número de pratos por metro; H = altura equivalente ao prato; h = altura reduzida do prato.

Em geral recomenda-se que em um método cromatográfico otimizado o fator de retenção (k) dos compostos esteja na faixa de 2 – 10. Valores de $k < 2$ prejudicam a pureza do sinal cromatográfico devido os possíveis interferentes da matriz, já valores de $k > 10$ promove tempo de análise longo, maior largura da base e picos menos intensos. Podemos observar que os valores de k para os cinco fármacos analisados ficaram dentro dos valores recomendados.

Todos os fármacos apresentaram fator de separação (α) maior que 1,00 e número de pratos (N) suficientes para promover a separação cromatográfica. Outro parâmetro a ser analisado é a simetria da banda cromatográfica. Este parâmetro pode ser avaliado pelo fator

de alargamento (TF). Para fins de quantificação, recomenda-se que $TF < 2,00$, pois valores superiores a esse prejudicam a separação cromatográfica e a integração dos sinais devido a presença de cauda nos picos. Para picos com mesma intensidade e com valores de simetria próximos de 1,00 recomenda-se uma resolução (R_s) mínima de 1,50. Contudo neste trabalho, para fins de margem de segurança, a resolução para os pares críticos CET/NAP e FEN/FLU a resolução foi superior a 2,50.

4.4.3 Validação do método

Na validação, e também na aplicação do método, nenhuma etapa adicional a centrifugação e diluição da amostra foi realizada na urina antes da análise, exceto na determinação da forma hidrolisada. A seletividade do método foi avaliada com a injeção de seis amostras de urina sem a presença dos fármacos (branco) e nenhum interferente eluiu no tempo de retenção dos analitos de interesse (Figura 4.22). A linearidade foi avaliada através da curva analítica construída em amostras de urina fortificada em seis níveis diferentes. A Tabela 4.6 apresenta os valores da faixa de quantificação analítica, as equações da regressão linear e

Tabela 4.6 - Parâmetros da curva analítica para os anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) - cetoprofeno (CET), ibuprofeno (IBU), fenoprofeno (FEN), flurbiprofeno (FLU) e o naproxeno (NAP) (n = 30).

Fármaco	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dados da equação (a, b)	Coefficiente correlação (r^2)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CET	0,5 – 15	0,07704 -0,1123	0,9992	0,025	0,080
NAP	0,5 – 15	0,41763 0,06537	0,9996	0,010	0,025
FLU	0,5 – 15	0,6139 -0,01005	0,9974	0,070	0,200
IBU	0,5 – 15	0,06877 -0,01374	0,9994	0,50	0,150

a – coeficiente angular; b = coeficiente linear; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Figura 4.22 - Cromatograma do branco da urina e da urina fortificada com os fármacos no nível médio. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5).

os coeficientes de correlação (r^2) para cada fármaco. Para métodos bionalíticos recomenda-se um r^2 superior a 0,98 e os quatro fármacos analisados atenderam esse critério. Além dos coeficientes de correlação, uma ferramenta complementar de avaliar a linearidade da curva analítica é a construção do gráfico de resíduos. As Figuras 4.23 – 4.26 apresentam as curvas analíticas e os gráficos de resíduos para os fármacos avaliados. Podemos observar que não houve falta de ajuste para o modelo proposto.

Figura 4.23 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o cetoprofeno.

Figura 4.24 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o naproxeno.

Figura 4.25 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o flurbiprofeno.

Figura 4.26 - Curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para o ibuprofeno.

A sensibilidade do método é o aumento da resposta gerada pelo detector em função do aumento da concentração do analito. Ela pode ser expressa pela inclinação da curva analítica na qual quanto maior o valor da inclinação maior será a sensibilidade do método. Podemos

observar que o flurbiprofeno foi o que apresentou maior sensibilidade enquanto que o naproxeno foi o que atingiu os menores níveis de detectabilidade com um limite de detecção (LD) de 10 ng mL^{-1} e um limite de quantificação de 25 ng mL^{-1} . Em todas as curvas analíticas, o limite inferior de quantificação (LIQ) foi estabelecido em $0,50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite superior de quantificação (LSQ) em $15,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os estudos de precisão intra-dia e inter-dia foram expressas em desvio padrão relativo (DPR, %), onde os valores aceitáveis são abaixo de 20 % para o nível baixo (LIQ) e 15 % para os demais níveis (Tabela 4.7).

Os estudos de exatidão intra-dia e inter-dia foram expressos em percentagem de desvio na qual os valores aceitáveis também são abaixo de 20 % para o nível baixo (LIQ) e 15 % para os demais níveis (Tabela 4.8).

No ensaio da recuperação absoluta, o qual possui uma abordagem de recuperação real do processo, amostras de urina foram extraídas no modo *online*, contudo durante a etapa de eluição dos analitos da coluna MIP, a tubulação foi desconectada da coluna analítica e os

Tabela 4.7 - Precisão para o método de análise de NSAIDs em urina (n = 5).

Fármacos	Níveis	Precisão	Precisão	Precisão
		intra-dia 1 (DPR %)	intra-dia 2 (DPR %)	inter-dia (DPR %)
CET	Baixo	1,50	2,82	7,06
	Médio	0,64	0,91	1,79
	Alto	1,69	1,08	2,21
NAP	Baixo	1,92	1,39	1,60
	Médio	0,13	0,76	2,37
	Alto	0,80	0,83	1,09
FLU	Baixo	1,35	1,11	3,54
	Médio	0,46	1,16	4,21
	Alto	1,79	2,78	2,82
IBU	Baixo	5,16	6,28	5,45
	Médio	0,78	1,11	0,92
	Alto	0,33	2,28	1,61

Baixo = $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, Médio = $9,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 4.8 - Exatidão para o método de análise de NSAIDs em urina (n = 5).

Fármacos	Níveis	Exatidão	Exatidão	Exatidão
		intra-dia 1	intra-dia 2	inter-dias
		(%)	(%)	(%)
CET	Baixo	13,24	0,39	6,42
	Médio	1,99	1,08	0,45
	Alto	1,16	4,60	2,88
NAP	Baixo	8,64	9,19	8,92
	Médio	0,18	4,13	1,88
	Alto	0,69	2,13	1,41
FLU	Baixo	8,60	15,72	12,16
	Médio	3,66	4,18	0,26
	Alto	1,59	5,00	3,30
IBU	Baixo	3,59	4,67	4,13
	Médio	1,32	1,68	1,50
	Alto	0,60	1,54	1,08

Baixo = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Médio = $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

analitos recolhidos em um tubo do tipo *ependorf*. O equipamento foi configurado no modo unidimensional, e as alíquotas foram analisadas. Esses resultados foram comparados com injeções de padrões nos mesmos níveis de fortificação (Tabela 4.9). Esta não é a forma mais adequada para realizar a recuperação do método, pois as etapas de coleta do eluente promovem uma grande diluição da amostra e manuseio do analista. Assim, esses fatores podem levar a erros aleatórios no experimento. Devido às diluições da amostra, apenas os níveis médio e alto puderam ser avaliados pela recuperação absoluta, e os resultados ficaram dentro dos padrões aceitáveis (70 a 120 %).

Outra forma de avaliar a recuperação em sistemas *online* é através da recuperação relativa na qual se compara amostras fortificadas da urina com amostras fortificadas de padrões preparados em água na mesma concentração que a urina e submetidos ao processo de extração *online*. Por esse método, a recuperação relativa apresentou os valores de em torno de 100 % para todos os fármacos analisados. A comparação da extração realizada com a coluna MIP com o NIP foi avaliada, podendo-se observar que o polímero impresso sintetizado possui uma maior capacidade adsortiva para os NSAIDs em relação ao polímero controle.

Tabela 4.9 - Recuperações obtidas para os NSAIDs (n = 5).

Fármacos	Níveis	Recuperação absoluta (%)	Recuperação relativa (%)	Recuperação (%)
		MIP	MIP	NIP
CET	Baixo	-	99,32	57,82
	Médio	98,81	107,14	45,63
	Alto	107,27	101,32	38,18
NAP	Baixo	-	96,68	63,17
	Médio	97,62	102,03	41,79
	Alto	87,49	99,63	47,08
FLU	Baixo	-	102,23	64,65
	Médio	106,37	107,14	56,50
	Alto	103,76	101,32	51,18
IBU	Baixo	-	96,68	58,15
	Médio	108,64	102,03	49,98
	Alto	94,07	99,63	55,76
FEN (PI)	-	90,91	103,94	49,36

Baixo = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Médio = $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Em extrações *off-line*, normalmente o efeito matriz é calculado da mesma forma que apresentado como recuperação relativa, ou seja, comparando a área dos analitos na presença da matriz com a área na ausência da matriz. Nos sistemas *online*, uma maneira de avaliar o efeito matriz é realizar a injeção de seis lotes diferentes de urina de doadores individuais fortificadas nos níveis baixo e alto. Esta é uma recomendação da EMEA e após a análise em sextuplicata em cada nível, o DPR dos seis lotes não deve ser superior a 15 %. (117) Na Tabela 4.10 temos os dados de precisão e exatidão do ensaio de efeito matriz, e todos os valores obtidos estão de acordo com os níveis aceitáveis.

O efeito de memória é o resultado da presença dos analitos no sistema cromatográfico após o término da corrida cromatográfica. Normalmente é apresentado como pequenos picos cromatográficos no branco da matriz após a injeção dos analitos. Durante a validação foi feita a injeção do nível alto da curva analítica ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, posteriormente, o branco da urina.

Tabela 4.10 - Avaliação do efeito matriz (n = 6).

Fármacos	Nível	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
CET	Baixo	8,47	1,54
	Alto	2,88	1,50
NAP	Baixo	4,38	6,55
	Alto	2,25	1,92
FLU	Baixo	5,44	10,86
	Alto	3,13	2,35
IBU	Baixo	4,30	5,70
	Alto	6,73	4,15

Baixo = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

No cromatograma do branco analisado não houve sinal cromatográfico no tempo de retenção dos NSAIDs e, portanto o método de limpeza da coluna de extração foi efetivo para a eliminação do efeito de memória.

A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada em três níveis de fortificação (baixo, médio e alto) em sextuplicata de acordo com a decisão da comunidade europeia 2002/657/EC. (119) O primeiro conjunto de experimentos foi realizado em condições padrões de análise; o segundo conjunto foi feito com variação da temperatura da sala do equipamento de 22°C para 25°C e no terceiro conjunto as amostras foram preparadas por outro analista. Os valores de precisão e exatidão deste experimento estão apresentados na Tabela 4.11, ficando abaixo de 20 % para o nível baixo e 15 % para os demais níveis.

Esses NSAIDs possuem uma ampla faixa de dosagem que varia de 150 a 3200 mg por dia. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 0,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que, aplicando o fator de diluição de 50 %, corresponde à quantificação dos fármacos na urina entre 1,0 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Neste trabalho não foi aplicada uma maior faixa de trabalho devido a coluna analítica possuir 2,1 mm de diâmetro interno e, altas concentrações dos fármacos levariam ao alargamento de bandas cromatográficas, o que prejudicaria na quantificação dos analitos. Assim, foi necessário avaliar a influência da injeção direta e da diluição das amostras de urina (Tabela 4.12). Foi realizada a variação em um nível abaixo (sem diluição) e um acima (diluição urina:água (25:75, v/v)) em relação ao valor utilizado na validação (diluição urina:água (50:50, v/v)). As análises foram realizadas com a urina fortificada com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em

Tabela 4.11 - Resultados da reprodutibilidade intralaboratorial (n = 6).

Fármacos	Nível	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
CET	Baixo	0,60	17,94	19,14
	Médio	8,55	10,24	5,64
	Alto	13,75	12,97	8,31
NAP	Baixo	0,54	5,64	7,05
	Médio	8,61	5,12	4,33
	Alto	14,26	7,03	4,95
FLU	Baixo	0,57	4,42	15,17
	Médio	10,21	7,58	13,47
	Alto	16,34	5,26	8,97
IBU	Baixo	0,54	5,93	7,82
	Médio	7,90	2,54	12,22
	Alto	13,46	1,54	10,26

Baixo = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Médio = $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 4.12 - Avaliação da injeção direta e diluição da urina (n = 5).

Fármacos	Nível	Diluição amostra*	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
CET	—	-	8,53	0,15	14,70
	0	50:50	9,33	0,68	6,66
	+	25:75	10,75	0,09	7,45
NAP	—	-	9,09	0,36	9,11
	0	50:50	9,27	2,15	7,32
	+	25:75	10,21	3,40	2,11
FLU	—	-	8,65	0,37	13,54
	0	50:50	8,62	0,99	13,84
	+	25:75	8,96	0,08	10,45
IBU	—	-	8,52	0,17	14,82
	0	50:50	8,76	0,74	12,38
	+	25:75	10,06	2,08	0,60

*Diluição (urina:água, v/v).

quintuplicatas, e os valores de precisão e exatidão ficaram abaixo de 15 %. Entre os níveis avaliados, a injeção direta da urina apresentou a maior variação nos resultados. Assim, para realizar a quantificação de amostras de urina com concentrações inferiores a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ poderia realizar a injeção direta da amostra de urina no HPLC. Similarmente, para amostras nas quais a dosagem do fármaco fosse elevada, seria necessário um maior fator de diluição na urina para que as concentrações se enquadrassem dentro da faixa analítica.

Os ensaios de robustez foram realizados no nível médio de fortificação ($9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a influência dos sete parâmetros analíticos foram calculados em função da concentração dos fármacos, tempo de retenção, fator de retenção e fator de retenção relativo. A comparação e a avaliação dos resultados da robustez estão apresentadas na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Resultados da avaliação da robustez ($n = 3$).

Parâmetro avaliado	Fármacos	Desvio padrão (DP)	
		Robustez	Reprodutibilidade intralaboratorial
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CET	0,35	0,77
	NAP	1,38	0,34
	FLU	0,85	0,81
	IBU	0,06	0,20
Tempo de retenção (min)	CET	0,744	0,040
	NAP	0,925	0,040
	FEN	1,823	0,038
	FLU	2,283	0,037
	IBU	3,544	0,038
Fator de retenção (k)	CET	0,390	0,025
	NAP	0,492	0,025
	FEN	1,013	0,024
	FLU	1,279	0,023
	IBU	2,001	0,024
Fator de retenção relativo	CET	0,0246	0,0026
	NAP	0,0244	0,0022
	FLU	0,0141	0,0011
	IBU	0,0435	0,0033

Segundo a abordagem do teste de Youden, sempre que o desvio padrão do ensaio da robustez for significativamente maior que o desvio padrão, no mesmo nível, nas condições de reprodutibilidade intralaboratorial pode-se deduzir que o conjunto de fatores escolhidos tem influência no resultado, mesmo que isoladamente cada fator não influencie significativamente. (119)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.13, observa-se que para o cetoprofeno e ibuprofeno os mesmos se mostraram robustos frente à concentração dos fármacos. Já o desvio padrão das diferenças para o naproxeno e flurbiprofeno foram superiores ao da reprodutibilidade intralaboratorial e, portanto, não são robustos. A Figura 4.27 apresenta graficamente quais são os fatores que possuem maior influência na concentração dos fármacos. Podemos observar que o comprimento de onda (efeito F/f) apresenta maior influência, principalmente para o naproxeno e o flurbiprofeno. Assim, resolvemos investigar a origem desse grande efeito nos resultados desses dois fármacos.

A Figura 4.28 apresenta os gráficos das diferenças em relação a áreas absolutas coletadas na integração dos cromatogramas. Podemos observar que o efeito do comprimento

Figura 4.27 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez na concentração dos fármacos.

Figura 4.28 - Efeito dos parâmetros avaliados na robustez na área absoluta dos fármacos.

de onda para o cetoprofeno, ibuprofeno, e o fenoprofeno (PI) apresentam valores positivos, e que para o naproxeno e o flurbiprofeno apresentam efeito com valores negativos. Assim, podemos concluir que ao realizar o quociente da área do fármaco com a área do padrão interno para a obtenção da área relativa, haverá uma correção do efeito para os fármacos que tiverem valores de diferença no mesmo sentido que o PI, e o efeito aumentará para os compostos que vão em direção contrária ao PI.

Outro ponto interessante observado na Figura 4.28 é que a vazão da coluna de extração (Efeito E/e) também apresenta influência nos resultados, porém nos gráficos referentes aos efeitos na concentração (Figura 4.27) esse efeito é corrigido e minimizado.

Concluindo, podemos dizer que na determinação dos NSAIDs deve-se realizar um controle rígido dos parâmetros avaliados na robustez, principalmente em relação ao comprimento de onda, pois foi o parâmetro que mais apresentou influência na variação da concentração dos analitos.

No ensaio da robustez em relação ao tempo de retenção dos fármacos, o efeito da variação da proporção de metanol na fase móvel (efeito C/c) e da diminuição da vazão da bomba analítica (efeito B/b) foram os fatores que mais influenciaram. Já em relação ao fator de retenção, houve uma correção do efeito da vazão da bomba analítica; contudo o efeito C/c ainda influenciava nos deslocamentos dos picos cromatográficos. Podemos observar que quanto maior o tempo de retenção do fármaco na coluna analítica, maior é o desvio padrão das diferenças. Calculando o fator de retenção relativo, no qual se faz a correção do tempo de retenção em relação ao PI, podemos observar que o efeito crescente no desvio padrão das diferenças deixou de ser pronunciado, porém tanto no tempo de retenção, fator de retenção e fator de retenção relativo, os desvios padrões na robustez foram maiores que os do ensaio de reprodutibilidade intralaboratorial.

A Tabela 4.14 apresenta os tempos de retenção dos compostos avaliados como possíveis interferentes na determinação dos NSAIDs no arranjo *online*. Esses valores são uma estimativa através da comparação dos tempos de retenção dos interferentes no arranjo unidimensional, pois no sistema *online* não foi observado sinal cromatográfico referente aos interferentes fazendo o monitoramento dos comprimentos de onda de 220 e 254 nm (Figura 4.29). Assim, podemos concluir que a coluna MIP foi seletiva na retenção dos NSAIDs e na eliminação dos possíveis interferentes da análise.

Tabela 4.14 - Avaliação de interferentes na análise dos NSAIDs.

Composto	t _R (min)
Cafeína	8,12
Ácido acetilsalicílico	8,27
Norfluoxetina	8,96
Nicotina	11,37
Fluoxetina	26,15

Figura 4.29 - Cromatograma do branco da urina fortificada com os interferentes e monitorados nos comprimentos de onda de 220 e 254 nm.

A estabilidade dos fármacos foi avaliada durante todo o processo de validação analítica. Para cada ensaio foram preparadas três amostras de urina em dois níveis de fortificação (baixo e alto) com injeção em duplicata. A Tabela 4.15 mostra o estudo de estabilidade de curta duração na qual compara a percentagem de desvio de uma amostra de urina recém-fortificada e analisada com uma amostra fortificada e deixada em temperatura ambiente da sala de preparo de amostra durante 6 h e posteriormente analisada.

Tabela 4.15 - Estabilidade de curta duração da amostra fortificada (n = 3).

Fármacos	Nível	Desvio (%)
CET	Baixo	12,27
	Alto	8,54
NAP	Baixo	9,65
	Alto	5,09
FLU	Baixo	13,75
	Alto	4,98
IBU	Baixo	7,13
	Alto	6,46

Baixo = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

A Tabela 4.16 mostra a estabilidade pós-processamento das amostras de urina. A Análise 1 refere-se a urina fortificada e diluída deixada a temperatura do laboratório de preparo de amostras por 6 h. Na Análise 2, as amostras ficaram por 24 h no amostrador automático do HPLC à temperatura de 15°C antes de serem analisadas.

A estabilidade dos fármacos após ciclos de congelamento e descongelamento da amostra também foram avaliados. Primeiramente a amostra recém-preparada foi analisada, depois a urina foi congelada por 24 h, descongelada a temperatura ambiente e analisada novamente. Este ciclo se repetiu mais duas vezes e está presente na Tabela 4.17.

Tabela 4.16 - Estabilidade pós-processamento da amostra fortificada (n = 3).

Fármacos	Nível	Desvio (%)	Desvio (%)
		Análise 1	Análise 2
CET	Baixo	8,11	13,44
	Alto	4,46	7,54
NAP	Baixo	1,08	6,59
	Alto	5,25	7,33
FLU	Baixo	11,92	14,01
	Alto	3,06	8,97
IBU	Baixo	9,26	17,06
	Alto	0,92	4,00

Baixo = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Análise 1: amostra a temperatura ambiente por 6 h. Análise 2: amostra no amostrador automático a 15°C por 20 h.

Tabela 4.17 - Estabilidade da amostra após ciclos de congelamento/descongelamento (n = 3).

Fármacos	Nível	Desvio (%)	Desvio (%)	Desvio (%)
		Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
CET	Baixo	6,30	4,15	14,01
	Alto	8,90	4,46	4,71
NAP	Baixo	11,02	3,90	6,00
	Alto	12,16	1,08	2,41
FLU	Baixo	12,77	10,66	10,52
	Alto	10,82	3,06	0,75
IBU	Baixo	5,39	8,92	5,60
	Alto	3,57	0,94	0,81

Baixo = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$

A estabilidade de longa duração visa assegurar que as amostras permaneçam estáveis durante o início da validação até a última amostra ser analisada durante o processo. Assim, foi calculada a percentagem de desvio após a amostra de urina fortificada permanecer congelada por 60 dias (Tabela 4.18).

As soluções padrões intermediárias dos fármacos e do padrão interno armazenadas na geladeira apresentaram estabilidade com desvio abaixo de 14,56 % por um período de 20 dias e as soluções estoque armazenadas em congelador apresentaram estabilidade abaixo de 12,87 % no período de 60 dias.

Em todos os experimentos de estabilidade os DPR de cada ensaio ficaram abaixo de 16,13 %.

4.4.4 Determinação dos fármacos em amostras de urina

Os resultados das amostras de urina coletadas de seis voluntários que administraram uma dose de cetoprofeno, naproxeno ou ibuprofeno estão apresentados na Tabela 4.19. Foram analisadas amostras na forma livre e também na forma desconjugada após procedimento com hidrólise básica para promover a quebra de ligação dos fármacos com o ácido glucorônico. Podemos observar que após o processo de hidrólise, uma maior quantidade de fármaco é quantificada. Além disso, um decaimento da concentração dos fármacos ao longo do tempo também foi observado. Os resultados obtidos com as amostras reais estão em concordância com outros trabalhos relatados na literatura. (219, 221, 223)

Tabela 4.18 - Estabilidade de longa duração da amostra fortificada (n = 3).

Fármacos	Nível	Desvio (%)
CET	Baixo	9,01
	Alto	4,77
NAP	Baixo	6,81
	Alto	3,34
FLU	Baixo	6,07
	Alto	4,12
IBU	Baixo	2,84
	Alto	0,64

Baixo = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Alto = $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 4.19 - Concentrações dos NSAIDs em urina após administração de comprimidos.

Voluntário	Coleta da amostra (h)	Concentração na urina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		Forma livre	Forma desconjugada
Cetoprofeno 100 mg			
C1	2 – 4	20,75	61,87
	6 – 8	8,25	35,52
	10 – 12	1,13	5,43
C2	2 – 4	28,61	85,73
	6 – 8	10,32	27,31
	10 – 12	4,14	17,09
Naproxeno 250 mg			
N1	2 – 4	8,66	85,35
	6 – 8	4,05	64,79
	10 – 12	2,15	22,62
N2	2 – 4	10,43	93,98
	6 – 8	6,22	47,52
	10 – 12	3,41	16,23
Ibuprofeno 200 mg			
I1	2 – 4	7,36	50,40
	6 – 8	3,87	28,26
	10 – 12	1,70	10,06
I2	2 – 4	12,17	54,36
	6 – 8	5,85	37,18
	10 – 12	1,12	24,27

A integridade e a validade dos resultados da aplicação foram avaliadas pelo monitoramento de amostras de controle de qualidade. A Tabela 4.20 mostra a variação das amostras preparadas em quatro níveis diferentes. Segundo a RE 899, 67 % das amostras de CQ devem estar com valores de desvio abaixo de 15 %. Podemos observar que apenas o nível CQLIQ para o naproxeno apresentou valor acima do permitido, mas mesmo assim, o conjunto de amostras deste fármaco ficou com 75 % dos valores dentro do permitido.

Tabela 4.20 - Amostras de controle de qualidade.

Fármacos	CQ	Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Variação (%)
CET	CQLIQ	0,50	0,56	2,73
	CQB	1,50	1,53	1,68
	CQM	6,00	6,26	4,32
	CQA	12,00	11,73	2,25
NAP	CQLIQ	0,50	0,58	15,35
	CQB	1,50	1,51	0,99
	CQM	6,00	6,26	4,36
	CQA	12,00	11,93	0,62
FLU	CQLIQ	0,50	0,55	9,56
	CQB	1,50	1,52	1,41
	CQM	6,00	6,30	4,92
	CQA	12,00	12,11	0,95
IBU	CQLIQ	0,50	0,56	11,90
	CQB	1,50	1,41	6,24
	CQM	6,00	5,80	3,37
	CQA	12,00	11,69	2,57

4.5 Aplicação do método MISPE-LC-MS/TOF

Nos dias atuais, a hifenação entre a HPLC e a espectrometria de massas (MS) é uma poderosa ferramenta analítica empregada em diversos métodos de análise, pois concilia as vantagens da cromatografia líquida (seletividade e eficiência de separação) e espectrometria de massas (seletividade e detectabilidade). Neste sentido, resolvemos avaliar a potencialidade da utilização do sistema bidimensional para extração e separação com monitoramento por espectrometria de massas. O sistema *online* MISPE-LC-MS/TOF consistiu de um HPLC série Prominence 20A da Shimadzu (Kyoto, Japão). O sistema possui três bombas LC-20AD, um amostrador automático SIL-20A, um forno cromatográfico CTO-20A, um detector UV SPD-20A e uma controladora CBM-20A. As bombas, o amostrador e o detector foram acoplados a uma válvula seletora de seis vias e duas posições. O software LC-Solution (Shimadzu) controlou os módulos do sistema cromatográfico e também a válvula seletora.

A análise no MS foi realizada utilizando o analisador de massa quadrupolo/tempo de voo (QqTOF) da Bruker Daltonics operando no modo MS, e equipado com uma interface de *electrospray* (ESI) no modo de íon negativo. Os parâmetros otimizados no MS foram 4 kV de tensão capilar, 8 L h⁻¹ de gás dessolvatação, temperatura de solvatação de 200°C e 4 bar de pressão de nebulização. O MS foi operado no intervalo de 50 a 1550 m/z e o tempo de transferência de íons a partir de quadrupolo para TOF foi de 50 µs. Neste trabalho foi empregada a coluna MISPE (20 mm x 4,6 mm) seletiva para a extração dos profenos e a coluna analítica NST C18 (150 mm x 2,1 mm x 5 µm). As condições de vazão das bombas, programação das válvulas foram as mesmas desenvolvidas e otimizadas para o sistema MISPE-LC-UV. A proporção da fase móvel empregada foi de MeOH:H₂O (65:35, v/v) contendo 0,1 % de ácido acético.

A Figura 4.30 ilustra o cromatograma do íon extraído da extração dos NSAIDs em

Figura 4.30 – Cromatograma do íon extratido no modo MS da extração *online* dos NSAIDs (500 ng mL⁻¹) fortificados em água (sinal mais intenso) e urina humana diluída em água (sinal menos intenso).

água e em urina humana diluída 50 % em água conforme o método desenvolvido e validado. Pode-se observar que houve um grande efeito matriz no experimento, no qual uma supressão de até 70 % do sinal analítico foi observada. Assim, estudos mais aprofundados necessitam ser realizados nesta nova configuração do equipamento para avaliar métodos de minimizar o efeito matriz e também se o mesmo apresenta grande variação em lotes diferentes de amostra.

4.6 Conclusão

O MIP amino-funcionalizado foi sintetizado através da impressão do ibuprofeno utilizando o método sol-gel. O método de remoção do *template* das cavidades seletivas foi efetivo e o polímero sintetizado pode ser aplicado na extração seletiva do ibuprofeno e de mais quatro fármacos análogos pertencente a classe dos NSAIDs (cetoprofeno, naproxeno, fenoprofeno e flurbiprofeno).

O material sintetizado apresentou bons resultados de seletividade quando comparado com o NIP, e também na retenção dos fármacos de interesse com eliminação dos interferentes presentes na urina quando aplicados como fase extratora em SPE.

O método desenvolvido (MISPE-LC-UV) segue a tendência de análises simples, rápidas, reprodutíveis e seletivas. Neste trabalho a quantidade de amostra de urina utilizada foi pequena comparada com outros métodos de extração. Para cada amostra foram recolhidas alíquotas de 500 µL de urina e apenas 5 µL da amostra diluída foram injetadas no sistema de *column switching*. Além disso, a automação do sistema *online* minimizou o número de etapas comumente realizadas nos procedimentos da SPE fornecendo um tempo total de análise (extração e separação) de apenas 22 minutos.

O método desenvolvido apresentou resultados adequados para os parâmetros validados. Durante as análises, deve-se garantir que os parâmetros do método (principalmente o comprimento de onda monitorado) estejam em conformidade com os valores pré-determinados para não prejudicar a quantificação dos fármacos.

A aplicabilidade do método foi demonstrada através da análise de amostras reais de urina, coletadas de voluntários que fizeram a ingestão oral dos fármacos e analisadas na forma livre e conjugada.

Também foi realizada a demonstração da potencialidade de aplicar o método de extração e separação juntamente com as vantagens da espectrometria de massas (MISPE-LC-MS/TOF).

Capítulo 5

**Preparo e avaliação de partículas de sílica sub 1 μm
com aplicabilidade em cromatografia líquida de
ultra alta eficiência**

5.1 Introdução

Atualmente, independente do campo de atuação, o número de amostras que necessitam ser processadas e analisadas vem crescendo, continuamente. Adicionalmente, as cobranças por redução no tempo das análises também vem sendo discutidas com o intuito de desenvolver procedimentos rápidos e eficazes para análise qualitativa e quantitativa. Nesse contexto, a HPLC tem se destacado por ser uma técnica de análise na qual se conseguem determinar compostos polares e apolares, de baixa e alta massa molecular, devido as diversas combinações possíveis entre fase móvel e estacionária. No entanto, o tempo da corrida cromatográfica em análises convencionais geralmente é acima de 10 minutos e pode chegar próximo de 40 – 50 minutos dependendo da complexidade da separação. Assim, é importante desenvolver métodos rápidos ou ultra rápidos que forneçam tempo de análise inferior a 5 minutos, por exemplo. (56)

As abordagens e estratégias para diminuir o tempo de análise em HPLC incluem aumento da vazão da fase móvel, colunas analíticas mais curtas, partículas com diâmetro reduzido e elevação da temperatura de análise. Cada um destes parâmetros independentes está inter-relacionado com os parâmetros dependentes (tempo de análise, pressão no sistema e eficiência da coluna). (229) A Tabela 5.1 apresenta as relações entre os seis parâmetros, o qual é seguida por uma breve descrição de cada um dos parâmetros e o seu papel em análise rápida em HPLC.

Talvez a maneira mais óbvia de alcançar análises rápidas em HPLC é aumentar a vazão da fase móvel. Pela Tabela 5.1, a vazão é inversamente proporcional ao tempo de análise; assim, dobrar a vazão na coluna resultará em reduzir para a metade o tempo de análise. Infelizmente, a vazão também é proporcional à queda de pressão através da coluna e,

Tabela 5.1 – Correlação entre os parâmetros dependentes e independentes.

	Comprimento da coluna (L)	Vazão (F_c)	Tamanho da partícula (d_p)	Temperatura da coluna (T)
Tempo de análise	$\propto L$	$\propto 1/F_c$	Não relatado	$\propto 1/T^x$
Pressão	$\propto L$	$\propto F_c$	$\propto 1/(d_p)^2$	$\propto 1/T$
Eficiência (N)	$\propto L$	Curva de van Deemter	$\propto 1/d_p$	$\propto T$

Fonte: Adaptado de (33, 229).

como resultado, a pressão no sistema aumenta. Muitos métodos de HPLC operam acima da vazão ótima para conseguir análises rápidas; entretanto, deve-se tomar cuidado para que esse aumento não prejudique a resolução cromatográfica e, também, esteja dentro dos parâmetros permitidos da coluna e do sistema.

O aumento da temperatura de análise da coluna cromatográfica promove a redução da viscosidade da fase móvel e, conseqüentemente, uma diminuição na pressão do sistema. Assim, vazões mais elevadas podem ser empregadas dentro das condições permitidas pelo sistema. Outro fator importante é o melhoramento da transferência de massa do analito (termo C da equação de van Deemter). Como resultado, há um aumento na eficiência da coluna permitindo utilizar vazões mais altas. Adicionalmente, o aumento da temperatura promove uma menor retenção dos analitos e, conseqüentemente, análises mais rápidas. O uso da temperatura em LC possui a limitação da estabilidade das fases estacionárias. Fases baseadas em sílica apresentam problemas de dissolução em temperaturas acima de 60 – 70°C. Além disso, a maioria dos sistemas cromatográficos possui a temperatura máxima de uso entre 80 – 85°C. Como já discutido anteriormente, outros suporte cromatográficos tem sido desenvolvidos para utilizar altas temperaturas em sistemas de cromatografia líquida de alta temperatura (*high temperature liquid chromatography*, HTLC). (230, 231)

O tempo de retenção dos analitos e a eficiência cromatográfica são diretamente relacionados com o comprimento da coluna. A diminuição do tamanho da coluna para conseguir análises rápidas é aceitável desde que haja eficiência suficiente para promover a separação cromatográfica numa dada aplicação. Além disso, a diminuição no comprimento da coluna fornece menor pressão no sistema.

O termo C da curva de van Deemter referente à transferência de massa é o efeito dominante na eficiência da coluna quando se utiliza vazões elevadas. A diminuição do diâmetro da partícula fornece uma melhoria na transferência de massa. Como resultado, o termo C é minimizado levando a um aumento na eficiência da coluna (maior N) e, conseqüentemente, um menor valor de H conforme apresentado na Equação 20 e Figura 5.1.

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L}{hdp} \quad (20)$$

Figura 5.1 – Representação hipotética da curva de van Deemter com diferentes diâmetros de partícula.

Fonte: Adaptado de (232).

De acordo com a Equação 21, o diâmetro da partícula é inversamente proporcional a velocidade linear ótima ($u_{ótima}$) na separação cromatográfica. Assim, partículas pequenas fornecem uma $u_{ótima}$ maior e, como resultado, vazões elevadas podem ser empregados sem perder eficiência.

$$u = \frac{vD_m}{dp} \quad (21)$$

onde v é a velocidade reduzida da fase móvel e D_m é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel.

O tempo de análise pode ser definido como o tempo de retenção do analito mais retido na coluna. Assim, o tempo de análise sob condição isocrática pode ser representado pela Equação 22:

$$t_R = \frac{(1+k)L}{D_m v} dp \quad (22)$$

onde k é o fator de retenção do analito e L é o comprimento da coluna.

Observa-se a relação direta entre o tempo de análise e o tamanho da partícula. Uma diminuição no tamanho da partícula conduz a uma redução do tempo de análise nas condições ótimas.

A desvantagem de usar partículas pequenas é a pressão requerida para atingir a vazão ótima de separação. A queda de pressão através de uma coluna, ΔP , necessário para se obter uma velocidade linear de fase móvel ótima, $u_{\text{ótima}}$, é dada pela Equação 23:

$$\Delta P_{\text{ótima}} = \frac{\varphi \eta L}{dp^2} u_{\text{ótima}} = \frac{\varphi \eta (Nh dp)}{dp^2} \times \left(\frac{D_m v_{\text{ótima}}}{dp} \right) \quad (23)$$

onde η é a viscosidade da fase móvel e φ é a resistência a vazão.

Observa-se que a queda de pressão na coluna é inversamente proporcional ao quadrado do diâmetro da partícula. Assim, uma pequena diminuição no tamanho do suporte cromatográfico gera um grande aumento na pressão do sistema.

Anspach utilizou as Equações 22 e 23 para estimar a influência da diminuição no tamanho da partícula na pressão requerida e no tempo de análise. (233) O gráfico apresentado na Figura 5.2 mostra o resultado da pressão e tempo de análise em função do diâmetro da partícula assumindo $L = 15$ cm, $\varphi = 1000$, $\eta = 1$ cP, $D_m = 6,6 \cdot 10^{-6}$ cm² s⁻¹, $v = 2,5$, $h = 2,3$ e

Figura 5.2 - Pressão requerida (eixo esquerdo) e tempo de análise (eixo direito) em função do tamanho da partícula.

Fonte: Adaptado de (233).

$k = 10$ ou 20 . Pelo gráfico nota-se que quando o tamanho da partícula é reduzido abaixo de $1\ \mu\text{m}$, a pressão na coluna aumenta rapidamente enquanto que a redução no tempo de análise é pequena.

Devido a maior eficiência com o uso de partículas com diâmetro menor, pode-se diminuir o comprimento da coluna (diminuindo a pressão no sistema) sem comprometer a separação cromatográfica. A Figura 5.3 ilustra a separação de cinco alquilbenzenos com colunas de diferente tamanho de partículas e diâmetro interno de $2,1\ \text{mm}$. Observa-se que a resolução média não apresentou grande variação entre as três colunas; entretanto, o tempo de

Figura 5.3 – Separação de alquilbenzenos utilizando colunas com diferentes tamanho de partículas sob condições isocráticas.

Fonte: Adaptado de (234).

análise foi reduzido de 15 minutos (partícula de 5 μm) para abaixo de 2 minutos (partícula de 1,7 μm).

Outro exemplo da vantagem de colunas curtas com partículas pequenas é ao comparar a redução de coluna contendo partículas de 5 μm e 1 μm . Assumindo o fato que uma coluna de 250 mm contendo partículas de 5 μm gera 20000 pratos sob condições de vazão ótima, ao reduzir o tamanho da partícula para 1 μm e sob condições ótimas, a coluna necessitaria de 50 mm de comprimento para gerar os mesmos 20000 pratos. Como resultado, o tempo de análise cromatográfica utilizando coluna de 1 μm seria cerca de 25 vezes menor que a coluna contendo partículas de 5 μm . Entretanto, um aumento na pressão em torno de 25 vezes também é esperado. (234) Atualmente, os métodos de análise rápida em LC utilizam a estratégia de colunas curtas ($L = 20 - 50$ mm) contendo partículas pequenas (sub 2 μm) empregando vazões elevadas sem perder a eficiência e resolução cromatográfica.

Por outro lado, se o objetivo da análise é aumentar a eficiência e resolução de um método, colunas com tamanho tradicional ($L = 150 - 300$ mm) com as partículas pequenas tem demonstrado ser uma boa opção, apesar da limitação instrumental devido a pressão. Genômica, proteômica e metabolômica são algumas áreas de aplicação nos quais é importante utilizar método com grande capacidade de pico. (56)

O primeiro trabalho reportando o uso de partículas sub 2 μm foi conduzida por Bidlingmeyer em 1967. (235, 236) Entretanto, resultados irreprodutíveis foram obtidos devido a carência de desenvolvimento de métodos efetivos de empacotamento de colunas com partícula pequena. A primeira separação bem sucedida empregando ultra alta eficiência foi realizada pelo grupo de Jorgenson em 1997, o qual empregou uma coluna capilar (520 mm x 30 μm i.d.) contendo partículas de sílica não porosa de 1,5 μm . (237) A coluna gerou pratos na faixa de 140000 – 190000 na separação de moléculas pequenas com tempo de análise abaixo de 10 minutos e pressão no sistema de 4100 bar (60000 psi) com a vazão próxima do valor ótimo. Alguns anos mais tarde (2003), a pressão máxima do sistema foi aumentada permitindo realizar a separação com uma pressão de 7000 bar (103000 psi) e tempo de análise inferior a 4 minutos com um N de aproximadamente 300000 empregando uma coluna 430 mm x 30 μm x 1,0 μm , C18 não poroso. (232, 238)

O grupo de pesquisa de Milton Lee realizou diversos trabalhos empregando colunas de alta eficiência. Em seus trabalhos normalmente colunas com partículas não porosas e com comprimento inferiores a 150 mm eram empregadas para fornecer análises rápidas (menor que 1 minuto). (239, 240) Adicionalmente, o grupo também avaliou o uso de temperaturas

superiores a 60°C nas separações cromatográficas com alta eficiência. A Figura 5.4 exemplifica uma aplicação de uma coluna capilar com partículas C18 não porosa (150 mm x 50 µm x 1,0 µm) realizada na temperatura de 80°C e pressão de 2413 bar com tempo de análise de 36 segundos. (241)

Anspach avaliou a separação cromatográfica de uma mistura teste em diferentes pressões empregando uma coluna (150 mm x 1 mm i.d.) contendo partículas de sílica porosa de 1,5 µm de diâmetro (Figura 5.5). (233) A separação cromatográfica realizada a 345 bar (5000 psi), limite máximo dos sistemas cromatográficos convencionais, forneceu a separação cromatográfica em 10 minutos gerando uma eficiência de aproximadamente 25000

Figura 5.4 – Separação de compostos barbitúricos em coluna capilar (150 mm x 50 µm x 1,0 µm, C18 não poroso) com temperatura de 80°C.

Fonte: Adaptado de (241).

Figura 5.5 – Separação cromatográfica em diferentes pressões. Coluna (150 mm x 1,0 mm x 1,5 µm, C18).

Fonte: Adaptado de (233).

pratos/coluna com uma velocidade linear de $1,2 \text{ mm s}^{-1}$. Ao elevar a velocidade linear para $2,0 \text{ mm s}^{-1}$ a pressão foi aumentada para 621 bar (9000 psi) gerando uma eficiência de 30000 pratos/coluna. A velocidade linear ótima para a coluna foi atingida com $2,7 \text{ mm s}^{-1}$, com $N = 37000$, pressão de 966 bar (14000 psi) e tempo de análise inferior a 4 minutos. Ao empregar velocidade linear de 4 mm s^{-1} , acima do valor ótimo, o tempo de análise foi reduzido para 3 minutos e não foi observado perda da eficiência cromatográfica. Em contrapartida, a pressão do sistema foi elevada para 1380 bar (20000 psi).

Wu comparou a eficiência de colunas contendo partículas de sílica C18 porosa e não porosa com diâmetros de 3,0 e $1,5 \mu\text{m}$. (242) Como resultado, foi observado que as partículas não porosas; apresentam melhor desempenho em vazões elevadas em relação as partículas porosas, no entanto, essa diferença é diminuída quando o tamanho de partícula é de $1,5 \mu\text{m}$. Como já discutido, essa melhor eficiência é alcançada devido a rápida transferência de massa nas colunas contendo partículas não porosas. Em contrapartida, a capacidade de amostra injetada na coluna é cerca de 15 vezes maior quando utilizadas partículas porosas. Adicionalmente, os analitos apresentam maior retenção em partículas porosas do que em partículas não porosas. Assim, colunas com partículas de sílica não porosa necessitam de maior percentagem de fase aquosa para promover uma melhor retenção dos analitos. Além disso, partículas não porosas geram uma maior pressão quando comparadas com as partículas de sílica porosa. (234)

Mellors realizou a comparação de colunas contendo partículas de sílica não porosa de $1 \mu\text{m}$ com partículas de sílica híbrida porosa de $1,5 \mu\text{m}$. Foi observado que ambas as colunas apresentaram resultados similares para altura reduzida do prato e resistência mecânica em pressão de 4500 bar. (243)

Shen utilizou uma coluna ($100 \text{ mm} \times 50 \mu\text{m} \times 0,8 \mu\text{m}$) de sílica C18 porosa na área de proteômica. Uma grande capacidade de pico foi observada nesta aplicação. (244) Cintron realizou a síntese de partículas não porosas de sílica com diâmetro médio de $0,67 \mu\text{m}$; após a funcionalização com C18, preparou uma coluna $90 \text{ mm} \times 50 \mu\text{m}$ contendo as partículas sub $1 \mu\text{m}$. Empregando um sistema de UHPLC capaz de chegar em 3500 bar (50000 psi) foi possível promover a separação cromatográfica em 3,2 minutos com uma eficiência de 500000 pratos por metro. Apesar da alta pressão utilizada, a velocidade linear empregada na análise ($1,3 \text{ mm s}^{-1}$) foi inferior a velocidade linear ótima para a coluna ($3,0 \text{ mm s}^{-1}$). (245)

Atualmente, os sistemas comercialmente disponíveis para utilizar colunas de ultra alta eficiência possuem a pressão máxima de 1000 a 1350 bar. Nesse contexto apresentado, a

UHPLC, juntamente com as pesquisas em novos materiais, fornece grandes possibilidades de evolução nas diversas áreas de aplicação (ambiental, biológica, farmacêutica, proteômica, metabolômica, genômica).

5.2 Objetivos

Nesta parte do trabalho o objetivo foi desenvolver materiais baseados em sílica (sub 2 μm) pelo método sol-gel para atuar como suporte cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência visando obter colunas com alta eficiência e tempo de análise rápido. Adicionalmente, a caracterização físico-química e cromatográfica da coluna funcionalizada em fase reversa foi avaliada.

5.3 Experimental

5.3.1 Materiais e reagentes

Tetraetilortosilicato 95 % (TEOS) (Aldrich, Alemanha), hidróxido de amônio 28% (Fluka, EUA), etanol (Tedia, EUA), todos grau reagente foram utilizados sem purificação adicional. Na reação de funcionalização foram usados tolueno (Mallinckrodt, Mexico), imidazol (Mallinckrodt, Mexico), clorodimetiloctadecilsilano (ODS) e clorotrimetilsilano (TMS), ambos da Aldrich (EUA). Acetonitrila e metanol, ambos da Tedia (EUA) e grau HPLC foram usados no trabalho. A água ultrapura foi fornecida pelo sistema Elga Purelab Ultra (Inglaterra). Capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 50 e 250 μm foram adquiridos da Polymicro Technologies Inc. (EUA). Padrões analíticos de uracila, fenol, difenilamina, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno e naproxeno forma adquiridos pela Sigma-Aldrich (Alemanha) e os padrões de naftaleno e acenaftileno da Supelco (EUA).

5.3.2 Síntese da partícula de sílica

Para a síntese das partículas de sílica, foram avaliadas diferentes proporções de H_2O , EtOH e NH_4OH em relação ao TEOS conforme a Tabela 5.2.

Em um balão de fundo redondo foram adicionados H_2O , EtOH e NH_4OH . A solução foi homogeneizada por 10 minutos com agitação magnética a temperatura de 30°C com banho de óleo. Posteriormente, TEOS foi adicionado na solução e permaneceu sob agitação por 4 h. As partículas de sílica foram separadas da solução por centrifugação (1509 g) e lavadas com água ultrapura até atingir pH próximo de 7. Por fim, as partículas de sílica foram secadas em estufa à 60°C por 12 h e a 100°C por 24 h.

Nos experimentos de crescimento de partícula, foram adicionadas partículas de sílica sintetizadas no experimento anterior a uma solução contendo H_2O ($4,5 \text{ mol L}^{-1}$) e NH_4OH (60 mol L^{-1}) em EtOH em um balão de fundo redondo. Esta mistura foi levada ao ultrassom por 5 minutos para evitar a aglomeração das partículas. Posteriormente, sob temperatura de 30°C controlada por banho de óleo e agitação magnética (700 rpm), foram adicionados na suspensão 2,2 mmol de TEOS, gota a gota, para promover o crescimento da partícula. Essas adições de TEOS ocorreram a cada 4 horas e variaram de 4 a 12 adições de TEOS. Para encerrar a reação, as partículas de sílica foram centrifugadas, lavadas com água e metanol e, posteriormente, secadas em estufa a 70°C por 12 h e 160°C por 24 h. As partículas foram calcinadas a 400°C por 5 h e 850°C por 5 h, rehidroxiladas com HCl 5 mol L^{-1} sob refluxo por 10 h, lavadas com água e metanol para remoção do ácido e secada por 48 h a 100°C em estufa a pressão reduzida.

Tabela 5.2 – Proporções dos reagentes utilizados no processo sintético.

Linha	Razão molar
	TEOS:EtOH:H ₂ O:NH ₄ OH
1	1:30:100:40
2	1:30:60:20
3	1:60:100:40
4	1:60:200:80
5	1:30:85:40
6	1:30:80:40
7	1:30:40:20
8	1:15:20:10
9	1:30:8:4

5.3.3 Funcionalização das partículas de sílica

Em um balão de duas bocas acoplado ao condensador Friedrich sob atmosfera de nitrogênio foram adicionadas 2 g da sílica em 10 mL de tolueno. Em seguida foram adicionadas 25 mg de imidazol dissolvido em 1 mL de tolueno e, posteriormente, 120 mg de ODS em 3 mL de tolueno. O sistema ficou em refluxo por 5 horas com aquecimento por banho de óleo e as partículas de sílica funcionalizadas foram filtradas e lavadas com tolueno, metanol, metanol:água (1:1) e metanol. A sílica foi seca em estufa a pressão reduzida na temperatura de 70°C por 24 h. Finalmente a sílica funcionalizada foi submetida ao processo de *endcapping* empregando 45 µL of TMS nas mesmas condições descritas acima.

5.3.4 Caracterização físico-química

A morfologia das partículas do MIP foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss-Leica/440) operando a 20 kV e as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. A área superficial e o diâmetro do poro foram medidos pela isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77K (Quantachrome Instruments) pelo método Braunaer-Emmett-Teller (BET). Análise elementar foi realizado no CHNS-O, modelo EA 1110 da CE Instruments. Os espectros de infravermelho (FT-IR) foram obtidos de 4000 a 400 cm⁻¹ no equipamento Bomem MB-102 empregando disco de KBr para preparar as amostras.

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo Avance III (400 MHz) com rotores de óxido de zircônio de 4 mm, velocidade de rotação de 5 kHz e campo magnético de 9,4 T. Análise de ²⁹Si RMN foram adquiridas a 79,46 MHz empregando a técnica de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP/MAS) com largura de pulso ($\pi/2$) de 5 µs, tempo de contato de 5 ms e intervalo entre os pulsos de 5 s. A temperatura da análise foi de 20,76°C, o número de scans foi de 3600 e ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (δ = 0 ppm) foi utilizado como padrão externo dos deslocamentos químicos. Os espectros de RMN ¹³C foram adquiridos a 100,56 MHz empregando a técnica de polarização cruzada, rotação no ângulo mágico e supressão das bandas laterais (CP/MAS/TOSS) com largura de pulso ($\pi/2$) de 5 µs, tempo de contato de 2 ms e intervalo entre os pulsos de 5 s. A temperatura da análise foi de 21,80°C, o

número de scans foi de 2048 e o adamantano ($\delta = 38.48$ ppm para o sinal mais intenso) foi utilizado como padrão externo dos deslocamentos químicos.

5.3.5 Método cromatográfico

Para avaliação da fase estacionária sintetizada, uma coluna capilar (40 mm x 250 μm) foi preparada no laboratório empregando a técnica de empacotamento por suspensão (*slurry packing technique*). (246) Aproximadamente 6 mg da fase estacionária foram sonicadas com 1 mL de THF:isopropanol (90:10) por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão foi transferida para um reservatório e empacotada utilizando uma bomba Haskel com pressão inicial e 200 bar e pressão final de 500 bar, empregando metanol como solvente.

O sistema cromatográfico foi composto por uma bomba LC-20AD, um detector SPD-M10A_{VP} DAD, uma controladora CBM-20AD, e software LC solution, todos da Shimadzu. Uma válvula modelo EPCI4W.06 da Valco (EUA) com alça de amostragem (*loop*) interno de 60 nL conectada a um atuador elétrico foi utilizado como sistema de introdução de amostra. Uma cela de detecção *labmade* no formato em “U” com 7,92 mm de caminho ótico e volume de 35 nL foi utilizada no experimento. (247)

5.4 Resultados e discussões

5.4.1 Síntese da partícula de sílica

Inicialmente foi utilizada uma adaptação da metodologia desenvolvida por Tani no preparo das partículas de sílica (3 – 4 μm) pelo método sol-gel. (248) Assim, foi preparada uma solução (solução A) contendo 11 mL de H₂O, 0,1 mL de hidróxido de amônio e 7 mL de etanol. Na síntese das partículas, 4 mL da solução A foi transferida para um balão reacional e 2 mL de TEOS foi adicionado na solução. O sistema ficou mantido a 60°C sob agitação magnética em sistema fechado. Após 24 h de reação verificou-se a formação de um gel no balão reacional. O gel foi lavado com etanol e, posteriormente, secado em estufa com temperatura inicial de 40°C por 5 h e depois a 100°C por 24 h. A Figura 5.6A ilustra as partículas obtidas por esse processo sintético. Pode-se observar que as partículas apresentaram formato totalmente irregular. Uma tentativa de aprimorar a metodologia na obtenção de

Figura 5.6 - MEV das partículas de sílica obtidas após adaptações no procedimento experimental.

partículas esféricas foi promover a diluição do TEOS. Assim, foi repetida o processo de síntese empregando 8 mL da solução A e 500 μ L de TEOS. As partículas desse experimento apresentaram formato esférico (Figura 5.6B). Entretanto, observa-se que o material encontra-se aglomerado e com grande distribuição de tamanho das partículas.

Outras variações no procedimento experimental foram aplicadas na tentativa de conseguir sintetizar partículas esféricas, não aglomeradas e monodispersas. Contudo, sem sucesso.

Assim, resolvemos avaliar o procedimento experimental desenvolvido por Stober para a síntese das partículas. (78) Em um balão foram adicionados TEOS, H_2O , EtOH na seguinte razão molar 1:4:10. O sistema ficou sob agitação magnética durante 5 minutos para homogeneização da solução. Posteriormente, foi adicionado NH_4OH que permaneceu em reação por 4 horas. Após esse período, a solução apresentou aparência leitosa. As partículas foram removidas por centrifugação, lavadas com água e etanol e, posteriormente, secadas a temperatura de 40°C por 12 h e a 100°C durante 1 hora. Para avaliar a influência da quantidade de NH_4OH na reação, foram realizados quatro experimentos com a razão molar TEOS: NH_4OH de 1:0,5, 1:1, 1:1,5 e 1:2. A Figura 5.7 ilustra a morfologia das partículas obtidas nesses experimentos. Observa-se que a medida que a quantidade de NH_4OH é aumentada ocorre uma melhor formação de partículas esféricas. Entretanto, em todos os experimentos realizados houve a aglomeração entre as partículas esféricas de sílica.

Figura 5.7 – Microscopia das partículas de sílica obtidas pelo método de Stober com a razão molar TEOS:NH₄OH de (A) 1:0,5, (B) 1:1, (C) 1:1,5 e (D) 1:2.

Jia promoveu uma modificação no procedimento experimental de Stober no qual empregou maiores quantidade de hidróxido de amônio para o preparo das partículas de sílica. (249) No procedimento de preparo das partículas foram adicionados no balão reacional 2 mL de água ultrapura, 8 mL de etanol e 10 mL de hidróxido de amônio. A solução foi homogeneizada por 5 minutos utilizando agitação magnética. Em seguida, foi adicionado à solução 1 mL de TEOS, em uma única etapa. Após alguns minutos a solução ficou esbranquiçada e permaneceu sob agitação por 4 h. As partículas formadas foram separadas através de centrifugação, lavadas com água e etanol e, posteriormente, secadas em estufa a 40°C e posteriormente a 120°C. A Figura 5.8 ilustra as partículas de sílica obtidas nesse procedimento experimental. Pode-se observar que as partículas encontram-se esféricas (com diâmetro médio em torno de 400 nm), monodispersas e não estão aglomeradas.

Experimentos adicionais foram realizados fazendo variações nas razões molares entre os reagentes na tentativa de obter partículas de sílica com diâmetro maior. A Tabela 5.3 contem o diâmetro médio das partículas e o desvio padrão relativo (DPR %) para os nove experimentos realizados com diferentes proporções dos reagentes.

Figura 5.8 – Microscopia da partícula de sílica sintetizada com razão molar TEOS:NH₄OH de 1:20.

Tabela 5.3 – Diâmetro de partícula e desvio padrão relativo dos experimentos de acordo com a condição experimental utilizada.

Linha	Razão molar TEOS:EtOH:H ₂ O:NH ₄ OH	Diâmetro médio da partícula (nm)	DPR (%)
1	1:30:100:40	407,80	2,8
2	1:30:60:20	457,77	3,8
3	1:60:100:40	436,32	4,3
4	1:60:200:80	354,93	5,3
5	1:30:85:40	525,90	5,6
6	1:20:80:40	501,85	4,4
7	1:30:40:20	697,82	4,8
8	1:15:20:10	-	-
9	1:30:08:04	253,40	26,5

O diâmetro médio das partículas foi obtido através da contagem de uma população de 100 partículas nas imagens de microscopia. Adicionalmente, a morfologia das partículas sintetizadas está ilustrada na Figura 5.9. As partículas dos experimentos das linhas 1 - 5 apresentaram morfologia esférica e, devido ao baixo DPR, podem ser consideradas monodispersas. Entretanto no experimento da linha 6 surgiram algumas partículas com a morfologia em dubletos (duas partículas de sílica) juntamente com outras partículas esféricas.

Figura 5.9 – Microscopia das partículas de sílica sintetizadas de acordo com as condições especificadas na Tabela 5.3.

Já no experimento da linha 7, estes dubletos aparecem em maior proporção e surgem os tripletos e quadrupletos. O aparecimento destas partículas deformadas indica que o sistema reacional não está diluído o suficiente e ocorre o choque entre as partículas primárias durante o processo sintético levando a formação de dubletos. O experimento da linha 8 foi a condição reacional que apresentou maior concentração de TEOS e, como resultado, houve grande aglomeração das partículas que apresentou formato irregular. A quantidade de amônia no meio reacional é importante para que as partículas tenham morfologia esférica e monodispersa. No experimento da linha 9 podemos observar que a quantidade de hidróxido de amônio utilizado foi inferior aos outros experimentos e como resultado as partículas apresentaram tamanhos variados e portanto não eram monodispersas ($DPR = 26,5 \%$).

Para a continuidade dos experimentos, a condição da linha 2 da Tabela 5.3 foi escolhida. Foram realizados três experimentos em dias diferentes, na mesma condição reacional, para avaliar a repetitividade da síntese (Tabela 5.4).

Como resultado, as partículas nos três experimentos apresentaram diâmetro na faixa de 380 – 530 nm. O diâmetro médio e o DPR para o ensaio inter-dia foram de 448 nm e 5,4 %, respectivamente. O baixo valor de DPR obtido indica que o processo possui repetitividade e que as partículas de sílica possuem uma estreita faixa de distribuição.

Bogush desenvolveu em 1988 uma equação para estimar o diâmetro da partícula em função da concentração de TEOS, água e amônia no meio reacional com erro de predição de até 28 %. (250) Em 2007, Razink realizou pequenas correções na equação de Bogush no qual diminuiu o erro de predição para 20 % (Equação 24). (251)

$$dp = A[H_2O]^2 \exp(-B[H_2O]^{1/2}), \quad (24)$$

onde,

$$A = [TEOS]^{1/2} (82 + 151[NH_3] + 1200[NH_3]^2 - 366[NH_3]^3)$$

$$B = 1,05 + 0,523[NH_3] - 0,128[NH_3]^2$$

A Equação 24 foi aplicada nas concentrações experimentais da Tabela 5.4 e o valor de diâmetro médio calculado para partículas (dp_{calc}) foi de 435 nm. Como resultado, os valores obtidos experimentalmente (dp_{exp}) foram próximos aos valores. A aplicação desse material como suporte cromatográfico em HPLC é dificultoso, pois o diâmetro reduzido das partículas (abaixo de 0,5 μm) promoveria um grande aumento na pressão do sistema cromatográfico. Assim, estudos foram conduzidos na tentativa de aumentar o tamanho médio das partículas de sílica.

Para aumentar o tamanho das partículas de 400 nm foi avaliado o método denominado crescimento de partícula, o qual consiste em adições de TEOS no meio reacional contendo uma suspensão das partículas sintetizadas anteriormente em água, etanol e amônia. O TEOS

Tabela 5.4 - Avaliação da repetibilidade do preparo da partícula.

Experimento	Razão molar TEOS:EtOH:H ₂ O:NH ₄ OH	dp_{exp} (nm) ^a	DPR (%)	dp_{calc} (nm)	dp_{exp}/dp_{calc} (%)
1		424	3,6		97,5
2	1:30:60:20	457	3,8	435	105,2
3		462	3,2		106,3

^a diâmetro médio das partículas de sílica; dp_{exp} = diâmetro médio experimental; dp_{calc} = diâmetro médio calculado.

adicionado na suspensão sofrerá o processo de hidrólise e, posteriormente, o processo de condensação na superfície da partícula em suspensão e, por fim, o aumento no diâmetro da partícula.

A primeira condição experimental avaliada foi baseada no trabalho publicado por Chou (80), no qual 500 mg das partículas de sílica preparadas pelo método de Stober foram suspensas em 25 mL solução etanólica contendo hidróxido de amônio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) e água (10 mol L^{-1}) em ultrassom por 5 minutos. Posteriormente, sob agitação magnética, foram adicionados, em única etapa, TEOS no balão reacional para que a concentração na suspensão fosse de $0,09 \text{ mol L}^{-1}$. A suspensão ficou em agitação magnética em balão fechado por 3 h e posteriormente as partículas foram separadas por centrifugação, lavadas com água e secadas em estufa. A Figura 5.10 ilustra a microscopia das partículas obtidas neste experimento. Podemos observar que ao invés de promover o crescimento das partículas, o TEOS adicionado promoveu a aglomeração das partículas existentes na suspensão.

Na tentativa de promover o aumento do tamanho da partícula sem promover a aglomeração, foram conduzidos experimentos baseados no estudo realizado por Chang (79) com uma maior dispersão das partículas para evitar colisões na suspensão. Adicionalmente, a quantidade de TEOS adicionada na solução foi feita lentamente (e diluída em 50 % em etanol para minimizar a formação de partículas secundárias). Assim, em um balão de fundo redondo, 100 mg da partícula semente foram suspensas em 70 mL de uma solução etanólica contendo amônia ($4,5 \text{ mol L}^{-1}$) e água (60 mol L^{-1}). A suspensão ficou sob agitação magnética a 600 rpm e temperatura de 30°C controlada por banho de óleo. Posteriormente, foram feitas adições de TEOS (0,5 mL, 2,2 mmol) diluído em etanol (50:50, v/v).

Figura 5.10 – MEV das partículas de sílica submetidas ao processo de crescimento da partícula semente.

Diferentemente do experimento anterior, a velocidade de adição da solução de TEOS no sistema reacional foi de 1 gota a cada 10 segundos e sua concentração na suspensão não ultrapassou o valor de $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. O balão reacional foi fechado e o sistema permaneceu sob agitação por 2 h. Posteriormente, outra alíquota de 2,2 mmol de TEOS diluído foi adicionado lentamente no sistema reacional. No total foram realizadas 12 adições de TEOS a cada 2 h. A Figura 5.11 ilustra a comparação das imagens de MEV e distribuição das partículas nesse experimento através da contagem de uma população de 100 partículas obtidas pelas imagens de microscopia.

A Figura 5.11A representa a partícula semente empregada como base no experimento. Após quatro adições de TEOS no sistema reacional percebe-se que o tamanho médio das partículas foi aumentado (Figura 5.11B) de 400 nm para a faixa de 700 – 900 nm sem a formação de aglomerados. Entretanto foi observado o surgimento de novas nucleações (partículas secundárias), pois algumas partículas na faixa de 200 – 400 nm foram encontradas. Após 8 adições de TEOS (Figural 5.11C), houve o aumento de tamanho das partículas de 700 -900 nm para a faixa de 1100 – 1300 nm. Contudo, houve um aumento de novas nucleações (mais de 40 % da partículas estavam na faixa de 400 -500 nm) que começaram a competir com as partículas maiores no processo de crescimento. Assim, também foram encontradas partículas com 600 - 800 nm. A Figura 5.11D ilustra as partículas obtidas após 12 adições de TEOS no sistema reacional. Pode-se observar que as partículas encontram-se em uma ampla faixa de distribuição (300 – 1800 nm) no qual cerca de 60 % são resultado de novas nucleações (400 – 500 nm).

Na tentativa de promover um processo de alimentação contínuo de TEOS no sistema reacional, foram conduzidos testes empregando uma bomba peristáltica. Assim, em um balão de fundo redondo, 100 mg da partícula semente foram suspensas em 70 mL de uma solução etanólica contendo amônia ($4,5 \text{ mol L}^{-1}$) e água (60 mol L^{-1}) conforme condições do experimento anterior. Entretanto, 4 mL de TEOS foi diluído para volume final de 10 mL com etanol e esta solução foi adicionada ao sistema reacional através da bomba peristáltica com vazão de aproximadamente $30 \mu\text{L min}^{-1}$ num tempo aproximado de 5,5 h. A Figura 5.12A representa as partículas obtidas neste processo, no qual o tubo de alimentação estava imerso na solução. A Figura 5.12B representa uma modificação no sistema no qual o tubo de alimentação estava suspenso dentro do balão reacional e a solução de TEOS foi adicionada por gotejamento. Pode-se observar que ambos os processos não foram satisfatórios no preparo de partículas monodispersas próximas de 1000 nm, pois houve o processo de aglomeração das partículas sementes ou o surgimento de novas nucleações.

Figura 5.11 – MEV e distribuição das partículas obtidas no processo de crescimento de partícula semente. (A) partícula semente, (B) após 4 adições de 2,2 mmol de TEOS, (C) após 8 adições de 2,2 mmol de TEOS e (D) após 12 adições de 2,2 mmol de TEOS.

Figura 5.12 – MEV das partículas sintetizadas com a alimentação realizada com bomba peristáltica. (A) imersão direta na suspensão e (B) sistema de gotejamento na suspensão.

Para a continuidade do trabalho, optou-se por utilizar o procedimento no qual fornecesse partículas de sílica próximas de 1000 nm para caracterização e avaliação de seu desempenho como fase estacionária em HPLC. A imagem do MEV na Figura 5.13A ilustra as partículas de sílica obtidas através do crescimento da partícula utilizando apenas 4 adições de TEOS no sistema reacional. Pela imagem do MEV e do histograma (Figura 5.13B) observa-se que houve a formação de algumas partículas secundárias. Entretanto, podemos observar pelo gráfico de percentagem acumulada das partículas (Figura 5.13C) que uma quantidade inferior a 5 % das partículas são resultados de novas nucleações e estão na faixa de 450-550 nm. Já o restante das partículas, 95 %, estendem na faixa de 850 - 1000 nm. A Tabela 5.5 apresenta os valores obtidos de diâmetro médio das partículas e DPR para as partículas antes e após o

Tabela 5.5 – Comparação da distribuição das partículas de sílica antes e depois da reação de crescimento de partícula semente.

Parâmetro	Partícula base	Partícula após reação de crescimento
dp médio (nm)	424	895
DPR (%)	3,6	9,2
d ₁₀ (nm)	398	839
d ₅₀ (nm)	419	892
d ₉₀ (nm)	440	930
d ₉₀ /d ₁₀	1,105	1,108

Figura 5.13 – (A) MEV das partículas de sílica sintetizadas, (B) Histograma da distribuição das partículas e (C) Gráfico da percentagem acumulada das partículas.

processo de aumento de tamanho e informações sobre d_{10} , d_{50} , d_{90} e d_{90}/d_{10} . Pode-se observar que os valores próximos de 1,0 para d_{90}/d_{10} indica que as partículas sintetizadas possuem uniformidade.

As partículas de sílica foram submetidas ao tratamento térmico para elevar sua resistência mecânica e destruir matéria orgânica residual do processo de síntese. Durante o tratamento térmico há uma diminuição do número de silanos na superfície da sílica. Assim,

foi necessário realizar uma rehidroxilação da sílica com ácido antes da reação de funcionalização com o grupamento monofuncional C18 e *endcapping* com TMS.

5.4.2 Caracterização das partículas

A análise de BET das partículas de sílica sem a funcionalização forneceu um área superficial de $54 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e um diâmetro médio dos poros de 0,95 nm. Os baixos valores para a área superficial e diâmetro do poro caracterizam o material como não poroso. Os valores de microporos (abaixo de 2 nm) dificulta a penetração de moléculas maiores que a da água. Assim, os grupos silanois presentes nos microporos não são classificados como silanois na superfície das partículas de sílica. Análise elementar do material após a reação de funcionalização e *endcapping* indica a presença de 8,7 % de carbono ligado em sua estrutura.

O material sintetizado também foi caracterizado por infravermelho. O espectro de infravermelho da sílica antes da funcionalização possui bandas características de polímeros baseados em sílica (bandas 4-7 na Figura 5.14). (252) Em 3480 cm^{-1} , a banda larga é referente

Figura 5.14 - Espectro de Infravermelho da sílica pura e sílica C18. Bandas: (1) O-H, (2) C-H, (3) O-H, (4) Si-O-Si, (5) Si-OH, (6) Si-O e (7) Si-O.

ao estiramento da ligação O-H atribuída aos grupos silanois na partícula de sílica. A ausência de bandas na região de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ confirma que não há resíduo de TEOS no esqueleto polimérico da sílica preparada. (253, 254) Após a reação de funcionalização e *endcapping*, podemos observar o aparecimento de banda na região em $2950\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ atribuídas aos estiramentos de carbono alifático (C-H). Adicionalmente, o processo de funcionalização e *endcapping* promoveu uma redução da banda atribuída ao estiramento O-H. O sinal remanescente relacionado aos grupos OH é atribuído aos silanois localizados no interior da partícula (microporos) no qual não estão disponíveis para reação de funcionalização.

No espectro de RMN/CP/MAS ^{29}Si da sílica após, a funcionalização e *endcapping*, podemos observar o sinal em -111 ppm atribuído a espécie Q_4 (ligação siloxano) que está presente em todo material baseado em sílica (Figura 5.15A). O sinal em -102 ppm é referente a espécie Q_3 (silanol isolado) e, assim como no FT-IR, indica que há grupos silanois no material sintetizado. A ausência do sinal em -92 ppm confirma que nesta estrutura do material não há a presença das espécies Q_2 (silanol geminal). O sinal em 12 ppm no espectro de ^{29}Si aparece somente após a reação de modificação da superfície da sílica e é atribuído a sobreposição dos núcleos do átomo de silício tanto do grupamento C18 monofuncional quanto do átomo de silício do TMS (M). (255)

A morfologia da cadeia carbônica do grupamento C18 foi avaliada por ^{13}C RMN/CP/MAS/TOSS (Figura 5.15B). Trabalhos na literatura relatam que partículas de sílica funcionalizadas com grupos C18 monofuncionais apresentam sinais mais intensos no espectro de carbono em relação aos grupos C18 di e trifuncionais, pois a cadeia carbônica tem maior mobilidade. (256) O sinal em 0,45 ppm é atribuído carbono $C_{1'}$ do grupo C18 e aos carbonos do grupamento TMS. Devido as densidades eletrônicas relativamente altas em torno desses núcleos de carbono, forma-se uma blindagem contra o campo magnético provocando o aparecimento dos sinais em campo alto do espectro. (257) Os sinais em 12,30 ppm e 18,08 ppm são atribuídos aos carbonos C_{18} e C_1 , respectivamente. Já os sinais em 22,41 e 23,57 são referentes aos metilenos C_{17} e C_2 . O carbonos C_3 e C_{16} aparecem em campo mais baixo no espectro, com sinais em 33,98 ppm e 31,95 ppm. O sinal mais intenso no espectro (30,51 ppm) é referente aos carbonos centrais (C_{4-15}) ao longo da cadeia octadecil. A presença desses carbonos centrais nesta região do espectro indica que a cadeia C18 encontra-se na conformação desordenada, ou seja, seus carbonos apresentam grande mobilidade e há uma rápida troca entre as conformações *gauche* e *trans*. (132) Adicionalmente, Jinno observou que

Figura 5.15 – Espectro da sílica C18 não porosa sintetizada. (A) ^{29}Si RMN/CP/MAS e (B) ^{13}C RMN/CP/MAS/TOSS.

fases estacionárias que passaram pela etapa de *endcapping* possuem uma maior mobilidade no final da cadeia carbônica, provocando um aumento na intensidade dos sinais referente ao carbono C_{16} e C_{18} . (256)

5.4.3 Avaliação cromatográfica das partículas de sílica

Após o preparo, funcionalização e caracterização das partículas de sílica, foi realizado o processo de empacotamento das partículas de sílica (conforme procedimento descrito na

etapa 5.3.5) para sua avaliação na separação cromatográfica. A Figura 5.16 ilustra o esquema utilizado no preparo do corpo da coluna capilar de sílica fundida. Adicionalmente, a Figura 5.17 apresenta a imagem da coluna capilar com as partículas de sílica não porosa desenvolvida. Após o processo de preparo da coluna cromatográfica, o seu desempenho foi avaliado com uma solução teste contendo diferentes compostos: uracila (25 mg L^{-1}), fenol (200 mg L^{-1}), difenilamina (300 mg L^{-1}), naftaleno (30 mg L^{-1}) e acenaftileno (200 mg L^{-1}).

Figura 5.16 – Esquema de um tubo preparado para a confecção de coluna capilar empacotada.

Fonte: Retirado de (247).

Figura 5.17 – Imagem da coluna capilar desenvolvida (40 mm x 250 μm x 0,9 μm , C18).

A Figura 5.18 apresenta o cromatograma obtido na separação dessa solução teste utilizando MeOH:H₂O (30:70, v/v) como fase móvel no modo isocrático. A temperatura de análise foi mantida a 22°C e o comprimento de onda do DAD fixado em 220 nm. O volume de injeção foi de 60 nL. A vazão empregada na análise foi de 1,5 $\mu\text{L min}^{-1}$, no qual não é o valor ótimo para trabalhar com essas partículas. Entretanto, devido a alta pressão gerada pela partícula desenvolvida, não foi possível elevar a vazão da fase móvel. A partir do cromatograma gerado foram calculados os valores de fator de retenção (k), número de pratos por metro (N/m), assimetria medida em 10 % da altura do sinal do pico (As_{10}), altura equivalente ao prato (H), altura reduzida do prato (h), resolução (R_s) e fator de separação (α). Os parâmetros avaliados estão resumidos na Tabela 5.6.

A uracila foi utilizada como marcador do tempo morto. A ordem de eluição seguiu a hidrofobicidade dos analitos, ou seja, o menos hidrofóbico eluiu primeiro (fenol) e o mais hidrofóbico eluiu por último (acenaftileno). O par de compostos neutros (naftaleno e acenaftileno) foi utilizado para avaliar a hidrofobicidade da fase estacionária. Podemos observar que a resolução ($R_{s4,5}$) e a seletividade ($\alpha_{4,5}$) entre esse par de compostos foi de 3,2 e 1,31 respectivamente.

Figura 5.18 – Cromatograma obtido na separação da solução teste utilizando a coluna capilar com a fase estacionária C18 sub-1 μm . Ordem de eluição: uracila (1), fenol (2), difenilamina (3), naftaleno (4) e acenaftileno (5).

Tabela 5.6 – Parâmetros cromatográficos para a coluna sintetizada.

Composto	<i>k</i>	N/m	H (μm)	<i>h</i>	As ₁₀	<i>α</i>	Rs
Uracila	0,00	-	48,61	54,01	1,21	-	-
Fenol	0,24	26951	37,10	41,23	1,60	-	-
Difenilamina	2,48	91306	10,95	12,17	1,40	-	-
Naftaleno	3,34	102506	9,75	10,84	1,25	1,31	3,20
Acenaftileno	4,52	108982	9,17	10,20	1,27		

Os picos cromatográficos apresentaram formato simétrico e o acenaftileno gerou uma eficiência de 108982 pratos/metros e, conseqüentemente, um H no valor de 9,17. Os valores obtidos para H e h não são satisfatórios, entretanto, esse valor pode estar relacionado com uma somatória de fatores que tornam o sistema (HPLC e coluna) inadequado. Um primeiro ponto a ser discutido está relacionado com a presença dos microporos na sílica sintetizada. Moléculas pequenas podem ficar aprisionadas nos microporos e sua lenta difusão no interior da partícula causa um aumento perceptível na banda cromatográfica e conseqüentemente diminui a eficiência da separação. Assim, esse tipo de material com microporos abaixo de 2 nm apresenta melhor desempenho em separações de macromoléculas.

Outro ponto que pode estar relacionado com a diminuição da eficiência da coluna cromatográfica é a restrição ao aumento da vazão da fase móvel devido à pressão gerada pelas partículas sub-1 μm. A velocidade linear média empregada na análise foi de 0,43 mm s⁻¹ no qual é um valor abaixo da velocidade linear adequada para esse tipo de partícula. Assim, a separação cromatográfica foi realizada na região da curva de Van Deemter no qual o termo B (difusão longitudinal) apresenta grande contribuição para o valor elevado de H. Além disso, na Tabela 5.6 observa-se que ocorre um aumento no número de pratos com o aumento do fator de retenção dos compostos analisados. Esta situação é um indicativo de que há uma dispersão extra coluna no sistema cromatográfico.

Para demonstrar o potencial de aplicabilidade das partículas sub-1 μm, a coluna preparada foi utilizada para a separação de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) conforme discutido no Capítulo 4. A Figura 5.19 ilustra o cromatograma da separação de 5 NSAIDs empregando a coluna C18 sub 1 μm desenvolvida. O método cromatográfico consistiu na separação isocrática empregando MeOH:H₂O (35:65, v/v) contendo 0,1 % de

Figura 5.19 – Cromatograma obtido na separação dos NSAIDs na concentração de 100 mg L^{-1} utilizando a coluna capilar com a fase estacionária C18 sub- $1 \text{ }\mu\text{m}$. Ordem de eluição: cetoprofeno (1), naproxeno (2), fenoprofeno (3), flurbiprofeno (4) e ibuprofeno (5).

ácido acético. A vazão foi de $1,5 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, a temperatura foi de 22°C e o comprimento de onda foi fixado em 220 nm . Os picos cromatográficos demonstraram boa simetria e os pares cetoprofeno/naproxeno e fenoprofeno/flurbiprofeno apresentaram resolução de 1,82 e 1,84 respectivamente com um tempo total de análise foi de apenas 9 minutos.

5.5 Conclusão

O método sol-gel empregando precursores alcoxissilanos forneceu partículas esféricas com um DPR abaixo de 4 %. Após os experimentos de aumento do tamanho de partícula, o DPR ficou abaixo de 10 % devido novas nucleações aparecerem nestes ensaios. A caracterização físico-química revelou que o suporte cromatográfico é considerado não poroso pois apresentam microporos em sua estrutura.

Devido a limitação instrumental (pressão máxima do sistema) durante a avaliação cromatográfica do trabalho, a velocidade linear utilizada estava cerca de seis vezes abaixo do valor mínimo considerado ótimo para partículas com este diâmetro. Desta forma, a eficiência e o tempo de análise foram prejudicados.

Capítulo 6

Conclusão geral e perspectivas futuras

6.1 Conclusão geral

O desenvolvimento de fase extratora utilizando silicato de sódio como precursor de baixo custo no processo sintético apresentou resultados adequados quando aplicada no método desenvolvido para análise de antidepressivos e quando comparada com fases extradoras comerciais conforme discutido nesta tese. Adicionalmente, a síntese do MIP para a extração seletiva dos fármacos mostrou-se efetiva. Além disso, a migração da SPE no modo *off-line* para o *online* forneceu um método simples e seletivo para a análise direta de NSAIDs em urina humana com o mínimo de pré-tratamento da amostra.

O desenvolvimento das colunas curtas empacotadas com partículas abaixo de 1 μm com sílica não porosa facilita a transferência de massa e aprimora a eficiência cromatográfica. Em outras palavras, a vazão da fase móvel pode ser aumentado sem comprometimento da separação dos analitos. Entretanto, materiais com essa característica necessitam de equipamentos capazes de operar em pressões elevadas no qual dependendo das dimensões da coluna é necessário trabalhar com pressões acima de 1000 bar para atingir a velocidade linear ótima para a coluna analítica.

6.2 Perspectivas futuras

O desenvolvimento desse trabalho fornece condições e possibilidade de desenvolver fases extradoras (preparo de amostra) e fases estacionárias (HPLC) com grupamentos diferentes dos encontrados atualmente no mercado. Nesta estratégia, seletividade diferenciada pode ser obtida e assim, extrações mais seletivas gerando extratos mais limpos ou aprimoramento de separações cromatográficas podem ser alcançadas.

Desta forma, no âmbito do preparo de amostra há a possibilidade de modificar o suporte cromatográfico com modificadores diferenciados. As fases desenvolvidas podem ser aplicadas em extrações de diferentes matrizes empregando SPE *off-line* ou *online* conforme descrito nesta tese. Além disso, há a possibilidade de aplicar em sistemas de extração miniaturizados, tais como o MEPS. Adicionalmente, as fases extradoras podem ser modificadas superficialmente com meio de acesso restrito (RAM) no qual os materiais apresentam características mistas no qual ocorre a combinação da cromatografia por exclusão e da cromatografia em fase reversa. (29, 40) Além disso, o método MISPE-HPLC-UV pode ser utilizado para extração seletiva dos NSAIDs em outras matrizes, tais como a ambiental.

A avaliação da coluna com partículas sub 1 μm em equipamentos de UHPLC (1000 bar) forneceria a possibilidade de trabalhar em vazões mais elevadas e melhorar a eficiência e tempo de análise.

Em relação às fases estacionárias para colunas cromatográficas, pode-se destacar a possibilidade de sintetizar fases suportadas na superfície da sílica com seletividade diferenciada. Como exemplo prático, pode-se citar o preparo de fases estacionárias contendo líquidos iônicos (ILs). Uma das principais vantagens da superfície imobilizada com fases estacionárias contendo IL é a possibilidade de alterar os cátions, ânions e a cadeia alquílica do líquido iônico. Esta vantagem fornece a capacidade de manipular a estrutura de IL na sílica e, consequentemente, as propriedades da fase estacionária. (258) Outro exemplo é a síntese de fases zwitteriônicas no qual possui grupos com carga positiva e negativa que permite mudar a seletividade da separação cromatográfica. Além disso, fases quirais podem ser desenvolvidas com aplicabilidade na separação enantiomérica.

Referências

1. DE LIMA GOMES, P. C. F.; BARLETTA, J. Y.; NAZARIO, C. E. D.; SANTOS-NETO, Á. J.; VON WOLFF, M. A.; CONEGLIAN, C. M. R.; UMBUZEIRO, G. A.; LANCAS, F. M. Optimization of in situ derivatization SPME by experimental design for GC-MS multi-residue analysis of pharmaceutical drugs in wastewater. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 4, p. 436-445, 2011.
2. BARLETTA, J. Y.; DE LIMA GOMES, P. C. F.; DOS SANTOS-NETO, Á. J.; LANCAS, F. M. Development of a new stir bar sorptive extraction coating and its application for the determination of six pesticides in sugarcane juice. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 11, p. 1317-1325, 2011.
3. GROSSI, P.; OLIVARES, I. R. B.; DE FREITAS, D. R.; LANCAS, F. M. A novel HS-SBSE system coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the analysis of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 20, p. 3630-3637, 2008.
4. CARMI, J. D.; OLIVARES, I.; GROSSI, P.; LANCAS, F. M. Refrigerated sorptive extraction: determination of BTEX in water samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 812-816, 2009.
5. SANTOS-NETO, A. J.; FERNANDES, C.; RODRIGUES, J. C.; LANCAS, F. M. Fluoxetine and norfluoxetine analysis by direct injection of human plasma in a column switching liquid chromatographic system. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 1, p. 78-85, 2008.
6. PINTO, J. S. S.; CAPPELARO, E. A.; LANÇAS, F. M. Design and construction of an on-line SPE-SFE-CGC system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 192-195, 2001.
7. PINTO, J. S. D. S.; LANÇAS, F. M. Hidrólise do óleo de *Azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.
8. RODRIGUES, J. C.; NETO, A. J. S.; FERNANDES, C.; ALVES, C.; CONTADORI, A. S.; LANÇAS, F. M. Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2, p. 208-212, 2006.
9. RODRIGUES, R.; LACERDA, C. A.; LANCAS, F. M. Coating of solid-phase microextraction fibers with chemically bonded silica particles: Selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, n. 9, p. 489-494, 2002.
10. LANCAS, F. M.; BARBIRATO, M. A. Chromatographic isolation of nitrogen-containing compounds in liquid fuels .1. Ti (IV) oxide grafted onto silica as stationary-phase. **Fuel Science & Technology International**, v. 12, n. 3, p. 493-506, 1994.

11. SARGENTI, S. R.; LANCAS, F. M. Design and construction of a simple supercritical-fluid extraction system with semipreparative and preparative capabilities for application to natural-products. **Journal of Chromatography A**, v. 667, n. 1-2, p. 213-218, 1994.
12. QUEIROZ, M. E. C.; LANCAS, F. M. Analysis of drugs in biological samples: automated "in-tube" solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.
13. ARAUJO, W. A.; LACERDA, C. A.; CAPPELARO, E. A.; LANCAS, F. M. Modified headspace-SPME-GC device for sampling volatile compounds in acidic medium. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 6-7, p. 624-628, 2003.
14. MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 153-180, 2003.
15. SEQUINEL, R.; HATANAKA, R. R.; GUALTIERI, C. E.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. D.; PASSARETTI FILHO, J. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2226-2232, 2010.
16. GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1069-1082,
17. NOVAKOVA, L.; VLCKOVA, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 2009.
18. MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, n. 1, p. 16-20, 1991.
19. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.
20. HENNION, M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.
21. ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 677-690, 2006.
22. WINEFORDNER, J. D. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003. 488 p.
23. THURMAN, E. M.; SNAVELY, K. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2000.
24. VERAART, J. R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. T. Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 483-514, 1999.

25. PUIG, P.; BORRULL, F.; CALULL, M.; AGUILAR, C. Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 664-678, 2007.
26. HANKEMEIER, T.; STEKETEE, P. C.; VREULS, J. J.; BRINKMAN, U. A. T. Automated at-line solid-phase extraction gas chromatographic analysis of micropollutants in water using the PrepStation. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1-2, p. 161-174, 1996.
27. SCHALLER, D.; HILDER, E. F.; HADDAD, P. R. Separation of antidepressants by capillary electrophoresis with in-line solid-phase extraction using a novel monolithic adsorbent. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, n. 1, p. 104-111, 2006.
28. BOOS, K. S.; GRIMM, C. H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 175-180, 1999.
29. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 97-115, 2007.
30. KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809-832, 2012.
31. SEGER, C.; GRIESMACHER, A. Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry in a routine clinical laboratory environment. **Biochemia Medica** v. 17, n. 1, p. 29-51, 2007.
32. LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. 382 p.
33. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. Hoboken: Wiley, 2010. 912 p.
34. MASQUE, N.; MARCE, R. M.; BORRULL, F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 384-394, 1998.
35. LEON-GONZALEZ, M. E.; PEREZ-ARRIBAS, L. V. Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 3-16, 2000.
36. PEREIRA, L. Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 11-12, p. 1687-1731, 2008.
37. RAVELO-PEREZ, L. M.; HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNANDEZ-BORGES, J.; RODRIGUEZ-DELGADO, M. T. Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2618-2641, 2010.

38. PHENOMENEX. **Catálogo**. 2012. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Hypercarb>>. Acesso em: 19 out. 2012.
39. ZODOI, L. **Avaliação do desempenho de diferentes tipos de nanotubos de carbono na determinação de íons metálicos e ácido mefenâmico**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química Universidade Federal de São Carlos, 2008.
40. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MORAES, M. C.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. **Bioanalysis**, v. 1, n. 3, p. 577-594, 2009.
41. HOLTZAPPLE, C. K.; STANKER, L. H. Affinity selection of compounds in a fluoroquinolone chemical library by on-line immunoaffinity deletion coupled to column HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 22, p. 4817-4821, 1998.
42. TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p. 87-99, 2010.
43. XU, Z.; CHEN, S.; HUANG, W.; FANG, G.; PINGZHU, H.; WANG, S. Study on an on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for separation and determination of trace estrone in environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 4, p. 1273-1279, 2009.
44. WATABE, Y.; KUBO, T.; NISHIKAWA, T.; FUJITA, T.; KAYA, K.; HOSOYA, K. Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 beta-estradiol in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1-2, p. 252-259, 2006.
45. FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Brasileian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.
46. HILL, H. Development of bioanalysis: a short history. **Bioanalysis**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2009.
47. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1997. 279 p.
48. CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 179 p.
49. NOGUEIRA, J. M. F. Mikhail S. Tswett: Um legado para a cromatografia moderna. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. n. 100, p. 51-56, 2006.
50. LEDERER, E. La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931. **Journal of Chromatography A**, v. 73, n. 2, p. 361-366, 1972.
51. MARTIN, A. J.; SYNGE, R. L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**, v. 35, n. 12, p. 1358-1368, 1941.
52. SMITH, R. M. **Gas and liquid chromatography in analytical chemistry**. Chichester: Wiley, 1988. 402 p.

53. PIEL, E. V. Accelerated microparticulate bed liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 670-672, 1966.
54. NEUE, U. D. **HPLC columns: theory, technology, and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 393 p.
55. COLLINS, C. H.; FARIA, A. M.; BOTOLLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.
56. NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1836-1848, 2006.
57. ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167-175, 1999.
58. ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.
59. FARRE, M.; PEREZ, S.; GONCALVES, C.; ALPENDURADA, M. F.; BARCELO, D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1347-1362, 2010.
60. ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.
61. HORVATH, C.; LIPSKY, S. R. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1227-1234, 1969.
62. HORVATH, C. G. Fast liquid chromatography: an investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967.
63. TAKEUCHI, T. Capillary columns in liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 1, p. 26-27, 2003.
64. TAKEUCHI, T. Development of capillary liquid chromatography. **Chromatography**, v. 26, n. 1, p. 7-10, 2005.
65. SCOTT, R. P. W. **Silica gel and bonded phases: their production, properties and use in LC**. Chichester: Wiley, 1993. 261 p.
66. UNGER, K. K.; LIAPIS, A. I. Adsorbents and columns in analytical high-performance liquid chromatography: a perspective with regard to development and understanding. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 10-11, p. 1201-1212, 2012.
67. SVEC, F.; PETERS, E. C.; SÝKORA, D.; FRÉCHET, J. M. J. Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 887, n. 1-2, p. 3-29, 2000.

68. ROUQUEROL, J.; AVNIR, D.; FAIRBRIGDE, C. W.; EVERETT, D. H.; HAYNES, J. H.; PERNICONE, N.; RAMSAY, J. D. F.; SING, K. S. W.; UNGER, K. K. Recommendations for the characterizations of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1739-1758, 1994.
69. OBERACHER, H.; HUBER, C. G. Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2002.
70. SNYDER, S. R.; KIRKILAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. New York: Wiley, 1997. 765 p.
71. ARSHADY, R. Beaded polymer supports and gels: I. Manufacturing techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 586, n. 2, p. 181-197, 1991.
72. BERTHOD, A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packing. **Journal of Chromatography A**, v. 549, n. p. 1-28, 1991.
73. PRADO, A. G. S.; FARIA, E. A.; PADILHA, P. M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 544-547, 2005.
74. HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.
75. UNGER, K. K. **Porous silica**: its properties and use as support in column liquid chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1979. 336 p.
76. ILER, R. K. **The chemistry of silica**: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. New York: Wiley, 1979. 866 p.
77. KICKELBICK, G. **Hybrid materials**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 498 p.
78. STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62-69, 1968.
79. CHANG, S. M.; LEE, M.; KIM, W.-S. Preparation of large monodispersed spherical silica particles using seed particle growth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 286, n. 2, p. 536-542, 2005.
80. CHOU, K.-S.; CHEN, C.-C. The critical conditions for secondary nucleation of silica colloids in a batch Stöber growth process. **Ceramics International**, v. 34, n. 7, p. 1623-1627, 2008.
81. UNGER, K. K.; KUMAR, D.; GRÜN, M.; BÜCHEL, G.; LÜDTKE, S.; ADAM, T.; SCHUMACHER, K.; RENKER, S. Synthesis of spherical porous silica in the micron and submicron size range: challenges and opportunities for miniaturized high-resolution chromatographic and electrokinetic separations. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1-2, p. 47-55, 2000.
82. SHIMURA, N.; OGAWA, M. Growth of nanoporous silica spherical particles by the Stöber method combined with supramolecular templating approach. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 78, n. 6, p. 1154-1159, 2005.

83. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 1, p. 1-30, 2004.
84. KEANE, D. A.; HANRAHAN, J. P.; COPLEY, M. P.; HOLMES, J. D.; MORRIS, M. A. A modified Stober process for the production of mesoporous sub 2 micron silica microspheres; applications in HPLC. **Journal of Porous Materials**, v. 17, n. 2, p. 145-152, 2010.
85. DANIELSON, N. D.; KIRKLAND, J. J. Synthesis and characterization of 2-um wide-pore silica microspheres as column packings for the reversed-phase liquid chromatography of peptides and proteins. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 2501-2506, 1987.
86. CHANG, H.; OKUYAMA, K. Optical properties of dense and porous spheroids consisting of primary silica nanoparticles. **Journal of Aerosol Science**, v. 33, n. 12, p. 1701-1720, 2002.
87. DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING. **Combustion and harmful emission control research center**. Disponível em: <<http://www.chec.kt.dtu.dk/>>. Acesso em: 01 nov. 2012.
88. MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.
89. TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
90. PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 952, n. 1-2, p. 1-11, 2002.
91. BUCHMEISER, M. R. New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports. **Journal of Chromatography A**, v. 918, n. 2, p. 233-266, 2001.
92. NAWROCKI, J.; RIGNEY, M.; MCCORMICK, A.; CARR, P. W. Chemistry of zirconia and its use in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 657, n. 2, p. 229-282, 1993.
93. PESEK, J.; MATYSKA, M.; RAMAKRISHNAN, J. Synthesis and characterization of titania based stationary phases using the silanization/hydrosilation method. **Chromatographia**, v. 44, n. 9, p. 538-544, 1997.
94. WINKLER, J.; MARMÉ, S. Titania as a sorbent in normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, n. 1-2, p. 51-62, 2000.
95. AKAMA, Y.; KANNO, H. Liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons with cerium (IV) oxide as packing material. **Analytica Chimica Acta**, v. 309, n. 1, p. 153-156, 1995.

96. SILVA, C. R.; AIROLDI, C.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Preparation and characterization of a new C18 urea phase based on titanized silica. **Journal of Chromatography A**, v. 1087, n. 1-2, p. 29-37, 2005.
97. SILVA, C. R.; AIROLDI, C.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. A new generation of more pH stable reversed phases prepared by silanization of zirconized silica. **Journal of Chromatography A**, v. 1191, n. 1-2, p. 90-98, 2008.
98. KANEKO, S.; MITSUZAWA, T.; OHMORI, S.; NAKAMURA, M.; NOBUHARA, K.; MASATANI, M. Separation behaviour of silica-containing mixed oxides as column packing materials for liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 669, n. 1-2, p. 1-7, 1994.
99. DAWKINS, J. V.; L. LLOYD, L.; P. WARNER, F. Chromatographic characteristics of polymer-based high-performance liquid chromatography packings. **Journal of Chromatography A**, v. 352, n. p. 157-167, 1986.
100. SVEC, F.; FRECHET, J. M. J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. **Analytical chemistry** v. 64, n. 7, p. 820-822, 1992.
101. SÝKORA, D.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 852, n. 1, p. 297-304, 1999.
102. MIYABE, K.; CAVAZZINI, A.; GRITTI, F.; KELE, M.; GUIOCHON, G. Moment analysis of mass-transfer kinetics in C18-silica monolithic columns. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 6975-6986, 2003.
103. MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; ISHIZUKA, N.; TANAKA, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 19, p. 3498-3501, 1996.
104. OHMACHT, R.; KELE, M.; MATUS, Z. Polymer coated stationary phases for liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 1989.
105. PETRO, M.; BEREK, D. Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 37, n. 9-10, p. 549-561, 1993.
106. BIEN-VOGELSANG, U.; DEEGE, A.; FIGGE, H.; KÖHLER, J.; SCHOMBURG, G. Syntheses of stationary phases for reversed-phase LC using silanization and polymer coating. **Chromatographia**, v. 19, n. 1, p. 170-179, 1984.
107. TONHI, E.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: II. Chromatographic evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 948, n. 1-2, p. 109-119, 2002.
108. HANSON, M.; UNGER, K. K. Polymer coatings as stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 368-373, 1992.

109. STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.; TCHAPLA, A. Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I. **Chromatographia**, v. 53, n. 1, p. S113-S131, 2001.
110. BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic methods**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 559 p.
111. SIGMA-ALDRICH. **Learning Center**. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/learning-center/chromatographic-selectivity.html>>. Acesso em: 08 nov. 2012.
112. WHITMIRE, M.; AMMERMAN, J.; LISIO, P. D.; KILLMER, J.; KYLE, D.; MAINSTONE, E.; PORTER, L.; ZHANG, T. LC-MS/MS bioanalysis method development, validation, and sample analysis: points to consider when conducting nonclinical and clinical studies in accordance with current regulatory guidances. **Jornal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. S4, n. p. 001, 2011.
113. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
114. ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 848-858, 2011.
115. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.
116. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p. 56-59.
117. EUROPEAN MEDICINE AGENCY. **Guidance on validation of bioanalytical methods**. London: 2009. 22 p.
118. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: bionanalitical method validation**. Rockville: 2001. 22 p.
119. EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC de 12 de agosto de 2002. **Official Journal of the European Communities**. Seção L 221, p. 8-36.
120. SIGMA-ALDRICH. **Catálogo**. 2012. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 11 nov. 2012.
121. SABER, A. L. On-line solid phase extraction coupled to capillary LC-ESI-MS for determination of fluoxetine in human blood plasma. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 295-299, 2009.
122. GOPINATH, S.; KUMAR, R. S.; ALEXANDER, S.; DANABAL, P. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of fluoxetine and olanzapine in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 9, p. 1077-1082, 2012.

123. PORTO, C. E. D.; MAIA, P. P.; DE FREITAS, D. F.; ARAUJO, R. C. C.; DE SIQUEIRA, M. E. P. B.; MARTINS, I.; DOS SANTOS-NETO, A. J. Liquid-phase microextraction for simultaneous chromatographic analysis of three antidepressant drugs in plasma. **Quimica Nova**, v. 35, n. 1, p. 72-76, 2012.
124. LI, Y.; EMM, T.; YELESWARAM, S. Simultaneous determination of fluoxetine and its major active metabolite norfluoxetine in human plasma by LC-MS/MS using supported liquid extraction. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 11, p. 1245-1251, 2011.
125. EBRAHIMZADEH, H.; SAHARKHIZ, Z.; TAVASSOLI, M.; KAMAREI, F.; ASGHARINEZHAD, A. A. Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification of floating organic droplet combined with HPLC-UV for the analysis of antidepressant drugs in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 11, p. 1275-1282, 2011.
126. ZHENG, M. M.; WANG, S. T.; HU, W. K.; FENG, Y. Q. In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 48, p. 7493-7501, 2010.
127. CHAVES, A. R.; LEANDRO, F. Z.; CARRIS, J. A.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 23, p. 2123-2129, 2010.
128. CHAVES, A. R.; SILVA, S. M.; QUEIROZ, R. H. C.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1-2, p. 295-302, 2007.
129. UNCETA, N.; UGARTE, A.; SÁNCHEZ, A.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 1, p. 178-185, 2010.
130. SUENAGA, E. M.; IFA, D. R.; CRUZ, A. C.; PEREIRA, R.; ABIB JR, E.; TOMINGA, M.; NAKAIE, C. R. Automated determination of venlafaxine in human plasma by on-line SPE-LC-MS/MS. Application to a bioequivalence study. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 4, p. 637-643, 2009.
131. FERNANDES, C.; VAN HOECK, E.; SANDRA, P.; LANCAS, F. M. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, n. 2, p. 201-207, 2008.
132. CHENG, J.; FONE, M.; ELLSWORTH, M. W. Solid state NMR study on the conformation and mobility of n-octadecyl chains in a silane coupling agent attached to the surface of colloidal silica. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 7, n. 2, p. 135-140, 1996.

133. TITATO, G. M.; LANCAS, F. M. Comparison between different extraction (LLE and SPE) and determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected PAHs in water samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 19, p. 3045-3056, 2005.
134. MELO, L. R.; NOGUEIRA, A. M.; LANCAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 1, p. 57-64, 2009.
135. FRANCESCHI, L.; FAGGIANI, A.; FURLANUT, M. A simple method to monitor serum concentrations of fluoxetine and its major metabolite for pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 2, p. 554-557, 2009.
136. PAULING, L.; CAMPBELL, D. H. The production of antibodies in vitro. **Science**, v. 95, n. 2469, p. 440-441, 1942.
137. PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643-2657, 1940.
138. POLYAKOV, M. V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 2, n. p. 799-805, 1931.
139. DICKEY, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 35, n. 5, p. 227-229, 1949.
140. ANDERSSON, H. S.; NICHOLLS, I. A. A historical perspective of the development of molecular imprinting. In: MOLECULARLY imprinted polymer: man made mimic of antibodies and their application in analytical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2000. v. 23, p. 1-19.
141. WULFF, G.; SARHAN, A. Über die Anwendung von enzymanalogue gebauten Polymeren zur Racemattrennung. **Angewandte Chemie**, v. 84, n. 8, p. 364-364, 1972.
142. TAKAGISHI, T.; KLOTZ, I. M. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 11, n. 2, p. 483-491, 1972.
143. VLATAKIS, G.; ANDERSSON, L. I.; MULLER, R.; MOSBACH, K. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, v. 361, n. 6413, p. 645-647, 1993.
144. SELLERGREN, B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 1578-1582, 1994.
145. YAN, H.; ROW, K. H. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 7, n. 5, p. 155-178, 2006.
146. WULFF, G.; SCHAUHOFF, S. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 395-400, 1991.

147. SHEA, K. J.; SASAKI, D. Y. On the control of microenvironment shape of functionalized network polymers prepared by template polymerization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 9, p. 3442-3444, 1989.
148. WULFF, G.; VIETMEIER, J. Enzyme-analogue built polymers, 26. Enantioselective synthesis of amino acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 190, n. 7, p. 1727-1735, 1989.
149. SILVA, R. G. D. C. **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. 2009. 137 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Unicamp, 2009.
150. BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C. Molecular imprinted polymers: useful tools for pharmaceutical analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 219-247, 2006.
151. HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33-72, 1990.
152. KATZ, A.; DAVIS, M. E. Molecular imprinting of bulk, microporous silica. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 286-289, 2000.
153. AIROLDI, C.; FARIA, R. F. D. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 84-88, 2004.
154. DÍAZ-GARCÍA, M. E.; LAÍNÑO, R. B. Molecular imprinting in sol-gel materials: recent developments and applications. **Microchimica Acta**, v. 149, n. 1, p. 19-36, 2005.
155. LEE, S. C.; CHUANG, F. L.; TSAI, Y. L.; CHEN, H. Studies on the preparation and properties of sol-gel molecularly imprinted polymer based on tetraethoxysilane for recognizing sulfonamides. **Journal of Polymer Research**, v. 17, n. 5, p. 737-744, 2010.
156. JIANG, X.; TIAN, W.; ZHAO, C.; ZHANG, H.; LIU, M. A novel sol-gel-material prepared by a surface imprinting technique for the selective solid-phase extraction of bisphenol A. **Talanta**, v. 72, n. 1, p. 119-125, 2007.
157. LIN, C. I.; JOSEPH, A. K.; CHANG, C. K.; WANG, Y. C.; LEE, Y. D. Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 2, p. 175-180, 2003.
158. HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 10, p. 1548-1565, 2009.
159. HAN, D.-M.; FANG, G.-Z.; YAN, X.-P. Preparation and evaluation of a molecularly imprinted sol-gel material for on-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of trace pentachlorophenol in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 2, p. 131-136, 2005.
160. YANG, H.-H.; ZHANG, S.-Q.; TAN, F.; ZHUANG, Z.-X.; WANG, X.-R. Surface molecularly imprinted nanowires for biorecognition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 5, p. 1378-1379, 2005.

161. FANG, G.-Z.; TAN, J.; YAN, X.-P. An ion-imprinted functionalized silica gel sorbent prepared by a surface imprinting technique combined with a sol-gel process for selective solid-phase extraction of cadmium (II). **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 6, p. 1734-1739, 2005.
162. SUN, Q.; XU, Z. X.; ZHANG, L. M.; XU, L.; ZHOU, J. The recent advance of molecularly imprinted on-line solid phase extraction and its application in sample pretreatment - A mini review. **Advanced Materials Research**, v. 415-417, n. p. 1799-1805, 2012.
163. DIAS, A. C. B.; FIGUEIREDO, E. C.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z. Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 988-996, 2008.
164. BJARNASON, B.; CHIMUKA, L.; RAMSTRÅM, O. On-Line Solid-Phase Extraction of Triazine Herbicides Using a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Sample Enrichment. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 2152-2156, 1999.
165. BOONJOB, W.; YU, Y. L.; MIRO, M.; SEGUNDO, M. A.; WANG, J. H.; CERDA, V. Online Hyphenation of Multimodal Microsolid Phase Extraction Involving Renewable Molecularly Imprinted and Reversed-Phase Sorbents to Liquid Chromatography for Automatic Multiresidue Assays. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 3052-3060, 2010.
166. CACHO, C.; TURIEL, E.; PEREZ-CONDE, C. Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1029-1035, 2009.
167. HOSHINA, K.; HORIYAMA, S.; MATSUNAGA, H.; HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 25, p. 4957-4962, 2009.
168. ZHANG, S.; YANG, G.; ZHENG, Z.; CHEN, Y. On-Line Preconcentration and Analysis of Metribuzin Residues in Corn Fields by Use of a Molecularly Imprinted Polymer. **Chromatographia**, v. 69, n. 7, p. 615-619, 2009.
169. GUO, L.; DENG, Q.; FANG, G.; GAO, W.; WANG, S. Preparation and evaluation of molecularly imprinted ionic liquids polymer as sorbent for on-line solid-phase extraction of chlorsulfuron in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6271-6277, 2011.
170. TANIGAWA, T.; WATABE, Y.; KUBO, T.; HOSOYA, K. Determination of bisphenol A with effective pretreatment medium using automated column-switching HPLC with fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 20, p. 2840-2846, 2011.
171. MULLETT, W. M.; WALLS, M.; LEVSEN, K.; BORLAK, J. R.; PAWLISZYN, J. Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 297-306, 2004.

172. NAKAMURA, M.; ONO, M.; NAKAJIMA, T.; ITO, Y.; AKETO, T.; HAGINAKA, J. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing scopolia extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 231-237, 2005.
173. YAN, H.; QIAO, F.; ROW, K. Molecularly Imprinted Monolithic Column for Selective On-Line Extraction of Enrofloxacin and Ciprofloxacin from Urine. **Chromatographia**, v. 70, n. 7, p. 1087-1093, 2009.
174. MOEIN, M. M.; JAVANBAKHT, M.; AKBARI-ADERGANI, B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 11-12, p. 777-782, 2011.
175. SHAH, K. A.; PEOPLES, M. C.; HALQUIST, M. S.; RUTAN, S. C.; KARNES, H. T. Microfluidic direct injection method for analysis of urinary 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) using molecularly imprinted polymers coupled on-line with LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 368-378, 2011.
176. ZHAO, C.; ZHAO, T.; LIU, X.; ZHANG, H. A novel molecularly imprinted polymer for simultaneous extraction and determination of sudan dyes by on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 45, p. 6995-7002, 2010.
177. THEODORIDIS, G.; ZACHARIS, C. K.; TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G.; ECONOMOU, A. Automated sample preparation based on the sequential injection principle: Solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer coupled on-line to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, n. 1-2, p. 69-76, 2004.
178. YU, J. C. C.; LAI, E. P. C. Molecularly imprinted polypyrrole modified carbon nanotubes on stainless steel frit for selective micro solid phase pre-concentration of ochratoxin A. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 7, p. 702-711, 2006.
179. JUNPING, W.; MINGFEI, P.; GUOZHEN, F.; SHUO, W. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by a sol-gel process for on-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography to detect trace enrofloxacin in fish and chicken samples. **Microchimica Acta**, v. 166, n. 3, p. 295-302, 2009.
180. JING, T.; NIU, J. W.; XIA, H.; DAI, Q.; ZHENG, H. Y.; HAO, Q. L.; MEI, S. R.; ZHOU, Y. K. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 12, p. 1469-1476, 2011.
181. JING, T.; WANG, Y.; DAI, Q.; XIA, H.; NIU, J.; HAO, Q.; MEI, S.; ZHOU, Y. Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2218-2224, 2010.

182. ZHAO, C.; GUAN, X.; LIU, X.; ZHANG, H. Synthesis of molecularly imprinted polymer using attapulgate as matrix by ultrasonic irradiation for simultaneous on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography determination of four estrogens. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, n. 0, p. 72-78, 2012.
183. CALDWELL, J.; HUTT, A. J.; FOURNEL-GIGLEUX, S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 105-114, 1988.
184. HUSSAIN, M.; JAVEED, A.; ASHRAF, M.; AL-ZAUBAI, N.; STEWART, A.; MUKHTAR, M. M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 1, p. 7-18, 2012.
185. OSIRI, M.; MORELAND, L. W. Specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a new choice of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. **Arthritis Care & Research**, v. 12, n. 5, p. 351-362, 1999.
186. MASQUÉ, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C. Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective On-Line Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol from Environmental Water. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 17, p. 4122-4126, 2000.
187. KOEBER, R.; FLEISCHER, C.; LANZA, F.; BOOS, K. S.; SELLERGRÉN, B.; BARCELO, D. Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2437-2444, 2001.
188. CARO, E.; MASQUÉ, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C. Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1-2, p. 169-178, 2002.
189. CARO, E.; MARCÉ, R. M.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C.; BORRULL, F. On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water. **Journal of Chromatography A**, v. 995, n. 1-2, p. 233-238, 2003.
190. SANBE, H.; HOSOYA, K.; HAGINAKA, J. Preparation of uniformly sized molecularly imprinted polymers for phenolic compounds and their application to the assay of bisphenol A in river water. **Analytical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 715-719, 2003.
191. WATABE, Y.; KONDO, T.; IMAI, H.; MORITA, M.; TANAKA, N.; HAGINAKA, J.; HOSOYA, K. Improved detectability with a polymer-based trapping device in rapid HPLC analysis for ultra-low levels of bisphenol A (BPA) in environmental samples. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 133-137, 2004.
192. WATABE, Y.; KONDO, T.; MORITA, M.; TANAKA, N.; HAGINAKA, J.; HOSOYA, K. Determination of bisphenol A in environmental water at ultra-low level by high-performance liquid chromatography with an effective on-line pretreatment device. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, n. 1-2, p. 45-49, 2004.

193. WATABE, Y.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; KUBO, T.; KONDO, T.; MORITA, M. Novel surface-modified molecularly imprinted polymer focused on the removal of interference in environmental water samples. **Chemistry Letters**, v. 33, n. 7, p. 806-807, 2004.
194. WATABE, Y.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; KONDO, T.; MORITA, M.; KUBO, T. LC/MS determination of bisphenol A in river water using a surface-modified molecularly-imprinted polymer as an on-line pretreatment device. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 6, p. 1193-1198, 2005.
195. WATABE, Y.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; KUBO, T.; KONDO, T.; MORITA, M. Novel surface modified molecularly imprinted polymer focused on the removal of interference in environmental water samples for chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1-2, p. 363-370, 2005.
196. WATABE, Y.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; KUBO, T.; KONDO, T.; MORITA, M. Shielded molecularly imprinted polymers prepared with a selective surface modification. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2048-2060, 2005.
197. OU, J. J.; HU, L. H.; HU, L. G.; LI, X.; ZOU, H. F. Determination of phenolic compounds in river water with on-line coupling bisphenol A imprinted monolithic precolumn with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 1001-1006, 2006.
198. SAMBE, H.; HOSHINA, K.; HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method - Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 130-137, 2007.
199. ZAMORA, O.; PANIAGUA, E. E.; CACHO, C.; VERA-AVILA, L. E.; PEREZ-CONDE, C. Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 6-7, p. 1745-1753, 2009.
200. HAGINAKA, J.; SANBE, H. Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5206-5210, 2000.
201. BOOS, K. S.; FLEISCHER, C. T. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 1, p. 16-20, 2001.
202. SANBE, H.; HAGINAKA, J. Restricted access media-molecularly imprinted polymer for propranolol and its application to direct injection analysis of B-blockers in biological fluids. **Analyst**, v. 128, n. 6, p. 593-597, 2003.
203. HANTASH, J.; BARTLETT, A.; OLDFIELD, P.; DENE, G.; O'RIELLY, R.; ROUDIERE, D.; MENDUNI, S. Use of an on-line imprinted polymer pre-column, for the liquid chromatographic-UV absorbance determination of carbaryl and its metabolite in complex matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, n. 1, p. 104-111, 2006.

204. COBB, Z.; SELLERGREN, B.; ANDERSSON, L. I. Water-compatible molecularly imprinted polymers for efficient direct injection on-line solid-phase extraction of ropivacaine and bupivacaine from human plasma. **Analyst**, v. 132, n. 12, p. 1262-1271, 2007.
205. HUGON-CHAPUIS, F.; MULLOT, J. U.; TUFFAL, G.; HENNION, M. C.; PICHON, V. Selective and automated sample pretreatment by molecularly imprinted polymer for the analysis of the basic drug alfuzosin from plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1196-1197, n. 0, p. 73-80, 2008.
206. HANTASH, J.; BARTLETT, A.; OLDFIELD, P.; DENES, G.; O'RIELLY, R.; ROUDIERE, D.; MENDUNI, S. Use of an on-line imprinted polymer pre-column, for the liquid chromatographic-UV absorbance determination of carbaryl and its metabolite in complex matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, n. 1, p. 104-111, 2006.
207. WANG, S.; XU, Z.; FANG, G.; DUAN, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, S. Synthesis and Characterization of a Molecularly Imprinted Silica Gel Sorbent for the On-Line Determination of Trace Sudan I in Chilli Powder through High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3869-3876, 2007.
208. HE, J.; WANG, S.; FANG, G.; ZHU, H.; ZHANG, Y. Molecularly Imprinted Polymer Online Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography-UV for the Determination of Three Sulfonamides in Pork and Chicken. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. p. 2919-2925, 2008.
209. WANG, S.; LIU, L.; FANG, G.; ZHANG, C.; HE, J. Molecularly imprinted polymer for the determination of trace ractopamine in pork using SPE followed by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 9, p. 1333-1339, 2009.
210. SUN, X.; HE, X.; ZHANG, Y.; CHEN, L. Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 79, n. 3, p. 926-934, 2009.
211. XU, W. J.; SU, S. F.; JIANG, P.; WANG, H. S.; DONG, X. C.; ZHANG, M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 46, p. 7198-7207, 2010.
212. XU, Z. X.; ZHOU, J.; ZHAO, D. Y.; QIAO, X. G.; YANG, J. M. Determination of Trace Para Red Residues in Foods through On-Line Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. C49-C54, 2010.
213. ZHANG, Z.; ZHANG, H.; HU, Y.; YAO, S. Synthesis and application of multi-walled carbon nanotubes-molecularly imprinted sol-gel composite material for on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of trace Sudan IV. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 173-180, 2010.

214. DUAN, Z. J.; FAN, L. P.; FANG, G. Z.; YI, J. H.; WANG, S. Novel surface molecularly imprinted sol-gel polymer applied to the online solid phase extraction of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid from pork muscle. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 7, p. 2291-2299, 2011.
215. WANG, S.; LI, D.; HUA, Z.; ZHAO, M. Molecularly imprinted monolith coupled on-line with high performance liquid chromatography for simultaneous quantitative determination of cyromazine and melamine. **Analyst**, v. 136, n. 18, p. 3672-3679, 2011.
216. OU, J.; KONG, L.; PAN, C.; SU, X.; LEI, X.; ZOU, H. Determination of dl-tetrahydropalmatine in *Corydalis yanhusuo* by l-tetrahydropalmatine imprinted monolithic column coupling with reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1117, n. 2, p. 163-169, 2006.
217. ZHUANG, X.; DONG, X.; MA, S.; ZHANG, T. Selective On-Line Extraction of Trans-Resveratrol and Emodin from *Polygonum cuspidatum* Using Molecularly Imprinted Polymer. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 8, p. 739-742, 2008.
218. HUANG, M. X.; PANG, W. S.; ZHANG, J.; LIN, S. D.; HU, J. A target analogue imprinted polymer for the recognition of antiplatelet active ingredients in *Radix Salviae Miltiorrhizae* by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 58, n. p. 12-18, 2012.
219. ARESTA, A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 643-647, 2005.
220. KAWANO, S.; TSUJI, S.; SATO, N.; KAMADA, T. NSAIDs and the microcirculation of the stomach. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 299-315, 1996.
221. NEVADO, J.; FLORES, J.; PEÑALVO, G.; DORADO, R. Determination of ibuprofen and tetrazepam in human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 1, p. 208-214, 2006.
222. PATEL, B.; VALENTOVA, J.; HUTT, A. Stereospecific analysis of flurbiprofen and its major metabolites in plasma and urine by chiral-phase liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 57, n. 1, p. 7-18, 2003.
223. DE OLIVEIRA, A. R. M.; CESARINO, E. J.; BONATO, P. S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 818, n. 2, p. 285-291, 2005.
224. CARO, E.; MARCE, R. M.; CORMACK, P. A. G.; SHERRINGTON, D. C.; BORRULL, F. A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 813, n. 1-2, p. 137-143, 2004.
225. HAGINAKA, J.; TAKEKIRA, H.; HOSOYA, K.; TANAKA, N. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 2, p. 331-339, 1999.

226. HUNG, C. Y.; HWANG, C. C. Analysis of ketoprofen and mefenamic acid by high-performance liquid chromatography with molecularly imprinted polymer as the stationary phase. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 9, p. 813-818, 2008.
227. FARRINGTON, K.; REGAN, F. Molecularly imprinted sol gel for ibuprofen: An analytical study of the factors influencing selectivity. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 653-659, 2009.
228. FAN, Y.; ZHANG, M.; FENG, Y. Q. Poly(acrylamide-vinylpyridine-N,N'-methylene bisacrylamide) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1099, n. 1-2, p. 84-91, 2005.
229. SMITH, J. H. **Chromatographic properties of silica-based monolithic columns**. 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Química) - Virginia Tech Chemistry Department, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002.
230. HEINISCH, S.; ROCCA, J.-L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 4, p. 642-658, 2009.
231. VANHOENACKER, G.; SANDRA, P. High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 1, p. 245-248, 2008.
232. JORGENSEN, J. W. Capillary liquid chromatography at ultrahigh pressures. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 129-150, 2010.
233. ANSPACH, J. A.; MALONEY, T. D.; COLÓN, L. A. Ultrahigh-pressure liquid chromatography using a 1-mm id column packed with 1.5- μ m porous particles. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 8, p. 1207-1213, 2007.
234. WU, N.; CLAUSEN, A. M. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 8, p. 1167-1182, 2007.
235. BIDLINGMEYER, B. A.; HOOKER, R. P.; LOCHMULLER, C. H.; ROGERS, L. B. Improved chromatographic resolution from pressure-induced changes in liquid-solid distribution ratios. **Separation Science**, v. 4, n. 6, p. 439-446, 1969.
236. BIDLINGMEYER, B. A.; ROGERS, L. B. Investigation of pressure-induced changes in the chromatographic selectivity of methyl and ethyl orange on silica gel. **Separation Science**, v. 7, n. 2, p. 131-158, 1972.
237. MACNAIR, J. E.; LEWIS, K. C.; JORGENSEN, J. W. Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 983-989, 1997.
238. JERKOVICH, A. D.; MELLORS, J. S.; JORGENSEN, J. W. The use of micron-sized particles in ultrahigh-pressure liquid chromatography. **LC-GC Europe**, v. 16, n. 6A, p. 20-23, 2003.

239. LIPPERT, J. A.; XIN, B.; WU, N.; LEE, M. L. Fast ultrahigh-pressure liquid chromatography: On-column UV and time-of-flight mass spectrometric detection. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 9, p. 631-643, 1999.
240. WU, N.; LIPPERT, J. A.; LEE, M. L. Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 911, n. 1, p. 1-12, 2001.
241. XIANG, Y.; LIU, Y.; LEE, M. L. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, n. 1-2, p. 198-202, 2006.
242. WU, N.; LIU, Y.; LEE, M. L. Sub-2 μm porous and nonporous particles for fast separation in reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, n. 1-2, p. 142-150, 2006.
243. MELLORS, J. S.; JORGENSEN, J. W. Use of 1.5 μm porous ethyl-bridged hybrid particles as a stationary-phase support for reversed-phase ultrahigh-pressure liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 18, p. 5441-5450, 2004.
244. SHEN, Y.; STRITTMATTER, E. F.; ZHANG, R.; METZ, T. O.; MOORE, R. J.; LI, F.; UDSETH, H. R.; SMITH, R. D.; UNGER, K. K.; KUMAR, D.; LUBDA, D. Making broad proteome protein measurements in 1-5 min using high-speed RPLC separations and high-accuracy mass measurements. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 23, p. 7763-7773, 2005.
245. CINTRON, J. M.; COLON, L. A. Organo-silica nano-particles used in ultrahigh-pressure liquid chromatography. **Analyst**, v. 127, n. 6, p. 701-704, 2002.
246. LANÇAS, F. M.; RODRIGUES, J. C.; FREITAS, S. S. Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17-18, p. 1475-1482, 2004.
247. MONTEIRO, A. M. **Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV e aplicação da programação de temperatura**. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.
248. TANI, K.; SUZUKI, Y. Syntheses of spherical silica and titania from alkoxides on a laboratory scale. **Chromatographia**, v. 38, n. 5-6, p. 291-294, 1994.
249. JIA, P.; LIU, X.; LUO, Y.; YU, M.; LIN, J. Sol-gel synthesis and characterization of $\text{SiO}_2@ \text{NaGd}(\text{WO}_4)_2\text{:Eu}^{3+}$ core-shell-structured spherical phosphor particles. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 154, n. 1, p. J39-J43, 2007.
250. BOGUSH, G. H.; TRACY, M. A.; ZUKOSKI IV, C. F. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 104, n. 1, p. 95-106, 1988.
251. RAZINK, J. J.; SCHLOTTER, N. E. Correction to "Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction" by G.H. Bogush, M.A. Tracy and C.F. Zukoski IV, *Journal of Non-Crystalline Solids* 104 (1988) 95-106. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 353, n. 30-31, p. 2932-2933, 2007.

252. FIDALGO, A.; ILHARCO, L. M. Correlation between physical properties and structure of silica xerogels. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 347, n. 1-3, p. 128-137, 2004.
253. ALMEIDA, R. M.; PANTANO, C. G. Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 68, n. 8, p. 4225-4232, 1990.
254. MUSGO, J.; ECHEVERRÍA, J. C.; ESTELLA, J.; LAGUNA, M.; GARRIDO, J. J. Ammonia-catalyzed silica xerogels: Simultaneous effects of pH, synthesis temperature, and ethanol:TEOS and water:TEOS molar ratios on textural and structural properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, n. 1-3, p. 280-287, 2009.
255. KAILASAM, K.; MÜLLER, K. Physico-chemical characterization of MCM-41 silica spheres made by the pseudomorphic route and grafted with octadecyl chains. **Journal of Chromatography A**, v. 1191, n. 1-2, p. 125-135, 2008.
256. JINNO, K. CP-MAS ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra for identification of functionality of octadecylsilica bonded phases. **Journal of Chromatographic Science**, v. 27, n. p. 729-734, 1989.
257. ALBERT, K. NMR investigations of stationary phases. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 3-4, p. 215-224, 2003.
258. QIU, H.; LIANG, X.; SUN, M.; JIANG, S. Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 10, p. 3307-3322, 2011.