

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Rafael Marques

AVALIAÇÃO DE FASE ESTACIONÁRIA MONOLÍTICA FOTOPOLIMERIZADA  
EM CAPILAR REVESTIDO EXTERNAMENTE POR FLUOROPOLÍMERO  
PARA USO EM ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR

Juiz de Fora

2013

Rafael Marques

**Avaliação de fase estacionária monolítica fotopolimerizada em capilar  
revestido externamente por fluoropolímero para uso em  
eletrocromatografia capilar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, área de concentração: Química Analítica, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-orientador: Dr. Fernando Antonio Simas Vaz

Juiz de Fora

2013

*Dedico este trabalho aos meus falecidos avós, Maria Rita e José Marques, por terem sido fundamentais em minha formação pessoal e infelizmente não estão mais presentes para acompanhar minhas conquistas; à minha mãe Simone, maior amiga e companheira, que me deu todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui; ao meu irmão Rodrigo, que me preenche com boas recordações da infância; e à Nina, minha irmã canina, que mesmo sem poder entender meu compromisso com essa dissertação, sempre esteve ao meu lado pacientemente me observando enquanto eu escrevia e me aguardando, cheia de amor, retornar do laboratório.*

## AGRADECIMENTOS

Ao *professor Marcone*, que acreditou em meu potencial e, sempre de bom humor, apoiou e incentivou o meu trabalho, proporcionando um grande aprendizado e agradável convivência.

Aos meus colegas do *Grupo de Química Analítica e Quimiometria*, que me acolheram de braços abertos, compartilharam prazerosos cafezinhos e me ajudaram sempre que foi preciso. Em particular ao *Fernando*, que abriu o caminho dentro do grupo para o estudo envolvendo colunas monolíticas e sem ele este trabalho não teria sido possível.

Ao *Dr. Ricardo Aucélio*, da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, por me receber de prontidão em seu laboratório e contribuir com este trabalho.

Aos membros das bancas de qualificação, *Dr. Keyller Bastos Borges*, e de defesa, *Dr. Claudimir Lucio do Lago*, e em especial ao *professor Rafael Arromba*, que foi membro em ambas. Obrigado por aceitarem o convite de participação e pelas críticas e sugestões pertinentes.

À *Universidade Federal de Juiz de Fora* e ao *Departamento de Química* pelo empenho em manter uma pós-graduação de alto nível e por me conceder a oportunidade de crescimento e contribuição acadêmica.

À CAPES, por me conceder a bolsa de mestrado, e finalmente aos órgãos financiadores dos projetos envolvidos, FAPEMIG e CNPq.

## RESUMO

Uma técnica analítica que nos últimos anos tem ganhado expressivo interesse na área de ciências das separações é a eletrocromatografia capilar cujas características principais são o uso de um fluxo eletrosmótico para eluir a fase móvel e o uso de colunas com diâmetro interno variando em torno de 100  $\mu\text{m}$ , o que possibilita obter separações altamente eficientes e com baixo consumo de solventes. Aliado a isso está o desenvolvimento de fases estacionárias monolíticas cujo preparo é relativamente fácil, permitem boa permeabilidade da fase móvel e possuem elevada área superficial.

No presente trabalho, uma fase estacionária monolítica baseada no monômero (3-metacriloxipropil)-trimetoxisilano fotopolimerizado diretamente no interior de capilares de sílica fundida (100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) foi avaliada na separação por eletrocromatografia capilar de misturas padrões dos esteroides estriol, estradiol e progesterona, bem como de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Foram utilizados capilares de sílica fundida com um revestimento externo de fluoropolímero transparente à radiação UV e alternativo aos tradicionais revestimentos de poliimida. Esse revestimento de fluoropolímero se mostrou adequado à polimerização iniciada por radiação UV próxima a 375 nm bem como para a detecção dos analitos propostos, não sendo necessário remover uma seção desse revestimento para criar uma janela de detecção.

Um planejamento fatorial  $2^3$  foi usado para encontrar um perfil de separação satisfatório dos três esteroides variando a fração de acetonitrila na fase móvel, a concentração do eletrólito  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e a voltagem aplicada durante as corridas. A condição com 30% v/v de acetonitrila, 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e -25 kV, apresentou tempo total de corrida menor que 10 minutos e boa resolução entre os pares críticos de picos (entre 1,1 e 1,9). O número de pratos teóricos por metro nessa condição foi de 1873, 3631 e 3886 para os picos do estriol, do estradiol e da progesterona, respectivamente.

A renovação da fase móvel entre as corridas permitiu a melhora significativa da repetibilidade dos eletrocromatogramas e, combinada com a pressurização simultânea de ambos os *vials* durante as corridas, preveniu a

instabilidade da corrente elétrica causada pela formação de bolhas e pela eletrólise.

Paralelamente, as colunas monolíticas foram testadas em um equipamento de cromatografia a líquido, mas os resultados não foram satisfatórios. As especificações do equipamento, tais como vazão de fase móvel e volume de injeção de amostra não se mostraram apropriadas para as dimensões das colunas.

Palavras-chave: Fases estacionárias monolíticas. Eletrocromatografia capilar. Esteroides.

## ABSTRACT

In recent years an analytical technique which has gained significant interest in separations science is the capillary electrochromatography whose main features are the use of electroosmotic flow to elute the mobile phase and the use of columns with an inner diameter ranging around 100  $\mu\text{m}$ , which allows obtaining highly efficient separations and low solvent consumption. Allied to this, the development of monolithic stationary phases whose preparation is relatively easy allows good permeability of the mobile phase and have high surface area.

In this work, a monolithic stationary phase based on 3-(methacryloxypropyl)trimethoxysilane monomer, photopolymerized directly within fused silica capillaries (100  $\mu\text{m}$  of inner diameter) was evaluated through electrochromatographic separations of standard mixtures of steroids: estriol, estradiol and progesterone, as well as some polycyclic aromatic hydrocarbons. Fused silica capillaries with an UV-transparent fluoropolymer external coating, alternative to traditional polyimide ones, were used. This fluoropolymer coating was adequate to the polymerization initiated by UV radiation close to 375 nm as well as for the detection of the proposed analytes. Besides, the removal of the coating section to create a optical detection window, was not necessary.

A  $2^3$  factorial design was used to find a satisfactory separation profile of the three steroids, by varying the fraction of acetonitrile in the mobile phase, the concentration of ammonium acetate electrolyte and applied voltage during runs. The condition with 30% v/v acetonitrile, 10  $\text{mmol L}^{-1}$  ammonium acetate and -25 kV showed a total run time of less than 10 minutes and a good resolution between the critical pairs of peaks (from 1.1 up to 1.9). The plate numbers per column meter in this condition was 1873, 3631 and 3886 for the estriol, estradiol and progesterone peaks, respectively.

The repeatability of the electrochromatograms was significantly improved with the renewal of the mobile phase between the runs and, in combination with simultaneous pressurization of both inlet and outlet vials, it prevented bubble formation and instability of electric current due to electrolysis.

In parallel, the monolithic columns were tested in liquid chromatography equipment, but the results were not satisfactory. The equipment specifications, such as mobile phase flow rate and sample injection volume, were not appropriate for the columns size.

Keywords: Monolithic stationary phase. Capillary electrochromatography. Steroids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de hidrólise e condensação do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano levando à formação de um dímero. ....	21
Figura 2: (a) estrutura simplificada de um dímero a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano; e (b) possível estrutura simplificada do polímero formado por adição radicalar. ....	21
Figura 3: Esquema mostrando a ancoragem de um trímero formado a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxisilano à parede interna do capilar de sílica fundida. ....	22
Figura 4: Formação de radicais a partir da fotólise do óxido de fenil-bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina. ....	22
Figura 5: Estrutura e nome dos sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados neste trabalho. ....	25
Figura 6: Estrutura e nome dos três esteroides utilizados neste trabalho. ....	26
Figura 7: Dispositivo de preenchimento a alta pressurização. ....	30
Figura 8: Fluxograma do processo de produção das colunas monolíticas. ....	32
Figura 9: Esquema do modo <i>short-end injection</i> mostrando também a pressurização dos <i>vials</i> . ....	34
Figura 10: Eletrocromatogramas obtidos em (A) uma coluna produzida em capilar TSU e (B) uma coluna produzida em capilar revestido com poliacrilato. Ordem de eluição: (F) tiouréia, (1) naftaleno, (2) acenafteno, (3) fluoreno, (4) fenantreno e (5) antraceno, diluídos em metanol a 1,0 mmol L <sup>-1</sup> . FM: NH <sub>4</sub> Ac 16,7 mmol L <sup>-1</sup> (60%) e acetonitrila (40%); voltagem: -20 kV; temperatura: 20 °C; injeção: -25 mbar por 5 s; detecção: 220 nm (linha cinza) e 250 nm (linha preta). ....	37

Figura 11: Eletrocromatogramas obtidos na injeção de (A) metanol (branco); e (B) mistura de estriol 1,20 mmol L<sup>-1</sup>, estradiol 1,52 mmol L<sup>-1</sup> e progesterona 1,14 mmol L<sup>-1</sup> em metanol. Picos: F - fluxo; S - sistema; 1, 2 e 3 - analitos. FM: NH<sub>4</sub>Ac 16,7 mmol L<sup>-1</sup> (60% v/v) e acetonitrila (40% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 5 s; detecção: 214 nm (linha cinza) e 247 nm (linha preta). Capilar TSU..... 39

Figura 12: Eletrocromatogramas de uma das réplicas de cada ensaio do planejamento fatorial da Tabela 4. Concentração dos analitos: estriol 4,03 mmol L<sup>-1</sup>; estradiol 4,33 mmol L<sup>-1</sup>; e progesterona 5,07 mmol L<sup>-1</sup> em metanol. Condições de análise conforme Tabela 3. Temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; detecção: 214 nm. Capilar TSU ..... 42

Figura 13: Eletrocromatogramas obtidos na injeção de (A) estriol 12,1 mmol L<sup>-1</sup>; (B) estradiol 13,0 mmol L<sup>-1</sup>; e (C) progesterona a 15,2 mmol L<sup>-1</sup> em metanol. Picos: 1 - estriol; 2 - estradiol; e 3 - progesterona. Condição do ensaio F: NH<sub>4</sub>Ac 20,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; detecção: 214 nm (estriol e estradiol) e 247 nm (progesterona). Capilar TSU. .... 44

Figura 14: Eletrocromatogramas do (A) gel contendo apenas excipientes e do (B) gel contendo estriol e estradiol. Picos: F - fluxo; S - sistema; 1 - estriol; e 2 - estradiol. FM: NH<sub>4</sub>Ac 20,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; Detecção: 214 nm. Capilar TSU..... 46

Figura 15: (A) Perfil da corrente durante 14 corridas eletrocromatográficas consecutivas. (B) Eletrocromatogramas de algumas corridas com injeção de tiouréia 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em metanol (números sobre os picos indicam a corrida). FM: NH<sub>4</sub>Ac 16,7 mmol L<sup>-1</sup> (60% v/v) e acetonitrila (40% v/v); voltagem:-20 kV; temperatura: 20 °C; injeção: -25 mbar por 5 s. Detecção: 214 nm. Capilar TSH. .... 47

Figura 16: (A) Perfil da corrente ao longo de 14 corridas consecutivas que incluíram mistura de padrões e amostras. (B) Eletrocromatogramas de quatro corridas da mistura de padrões (estriol 4,03 mmol L<sup>-1</sup>, estradiol 4,33 mmol L<sup>-1</sup> e progesterona 5,07 mmol L<sup>-1</sup> em metanol). FM: NH<sub>4</sub>Ac 20,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -25 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; Detecção: 214 nm. Capilar: TSH..... 48

Figura 17: Perfil da corrente de duas corridas eletrocromatográficas com pressurização (linha preta) e duas sem pressurização (linha cinza). FM: NH<sub>4</sub>Ac 20,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura: 20°C. .... 50

Figura 18: Gráfico *Box-plot* para as variáveis: tempo de retenção e número de pratos de duas colunas monolíticas preparadas de forma independente. O valor do número de pratos foi dividido por 10<sup>4</sup> para ficar dentro da escala. TC<sub>ij</sub>: tempo de retenção da coluna *i* na réplica *j*; NC<sub>ij</sub>: número de pratos da coluna *i* na réplica *j*. .... 52

Figura 19: Cromatogramas obtidos em uma coluna monolítica produzida em capilar revestido com poliacrilato: (A) acetonitrila (branco); (B) mistura de fenantreno, criseno e benzo[a]pireno 1,0x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> diluídos em acetonitrila. FM: acetonitrila (30% v/v) e água (70% v/v). Vazão: 0,15 mL/min. Injeção: 0,1 µL. Tamanho da coluna: 20,0 cm. Detecção: 250 nm (linha cheia) e 270 nm (linha tracejada)..... 53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de técnicas de cromatografia a líquido segundo CHERVET <i>et al.</i> (1996).....	24
Tabela 2: Composição da solução fotopolimerizável. ....	32
Tabela 3: Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> . ....	40
Tabela 4: Valores experimentais para cada ensaio do planejamento. ....	41
Tabela 5: Valores médios de resolução entre os picos para os ensaios com 30% v/v de acetonitrila. ....	43
Tabela 6: Valores médios das correntes médias* obtidas nos ensaios do planejamento.....	44
Tabela 7: Valores médios do tempo de retenção (t <sub>R</sub> ) e número de pratos por metro (N/m). ....	45
Tabela 8: Valores de desvio padrão relativo de quatorze corridas consecutivas. ....	49
Tabela 9: Tempos de retenção e números de pratos a meia altura de duas colunas monolíticas preparadas de forma independente. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Eletroforese Capilar)
CE+p	Eletroforese Capilar assistida por pressão
CEC	<i>Capillary Electrochromatography</i> (Eletrocromatografia Capilar)
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> (Eletroforese Capilar de Zona)
DPR	Desvio Padrão Relativo
DAP	Dispositivo de Preenchimento a Alta Pressurização
FE	Fase Estacionária
FEM	Fase Estacionária Monolítica
FEO	Fluxo Eletrosmótico
FM	Fase Móvel
FMBF	Óxido de fenil-bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina
GQAQ	Grupo de Química Analítica e Quimiometria
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia a Líquido)
MEKC	<i>Micelar Electrokinetic Chromatography</i> (Cromatografia Eletrocínética Micelar)
MPTMS	3-(metacriloxiopropil)-trimetoxisilano
N/m	Número de pratos teóricos por metro
pH	Potencial Hidrogeniônico
RRLC	<i>Rapid Resolution Liquid Chromatography</i> (Cromatografia a Líquido de Rápida Resolução)
$t_R$	Tempo de Retenção
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
$W_{1/2}$	Largura do pico a meia altura

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....	15
1.2. ELETROFORESE CAPILAR .....	15
1.3. ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR .....	16
1.4. FASES ESTACIONÁRIAS .....	17
1.4.1. Fases estacionárias monolíticas .....	18
1.4.1.1. Fases estacionárias monolíticas à base de sílica .....	19
1.4.1.2. Fases estacionárias monolíticas à base de polímeros orgânicos ....	19
1.4.1.3. Fases estacionárias monolíticas híbridas .....	20
1.4.1.4. Capilares transparentes à radiação UV e fotopolimerização <i>in situ</i> .	22
1.5. MINIATURIZAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	23
1.6. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS .....	25
1.7. HORMÔNIOS ESTEROIDES .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>29</b>
3.1. REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS .....	29
3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	29
3.3. PREPARO DAS COLUNAS MONOLÍTICAS .....	31
3.4. PROCEDIMENTO PARA ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR .....	33
3.4.1. Injeção .....	33
3.4.2. Utilização do sistema de pressão externa .....	34
3.4.3. Condicionamento e limpeza da coluna .....	35
3.5. PROCEDIMENTO PARA CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>36</b>
4.1. COLUNA MONOLÍTICA EM ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR .	36
4.1.1. Avaliação preliminar baseada na separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .....	36
4.1.2. Separação de hormônios esteroides .....	38
4.1.2.1. Teste preliminar para estriol, estradiol e progesterona .....	38
4.1.2.2. Planejamento fatorial para algumas condições de corrida .....	39
4.1.2.3. Testes com amostra de gel transdérmico contendo esteroides .....	45
4.1.3. Correção da instabilidade e das interrupções da corrente elétrica .....	47

4.1.3.1.	Instabilidade devido à eletrólise .....	47
4.1.3.2.	Instabilidade e interrupções devido à formação de bolhas .....	50
4.1.4.	Repetibilidade das corridas eletrocromatográficas .....	50
4.2.	COLUNA MONOLÍTICA EM CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....	52
4.3.	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CAPILAR REVESTIDO COM FLUOROPOLÍMERO.....	53
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Quando duas substâncias ou mais apresentam propriedades semelhantes frente a um sistema de detecção qualquer é comum que se recorra a alguma técnica de separação analítica capaz de determinar e quantificar separadamente os analitos sem que um interfira no sinal do outro. Podemos citar como técnicas mais expressivas de separação analítica em meio líquido a cromatografia a líquido e a eletroforese capilar.

### 1.1. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

A cromatografia a líquido (LC, *liquid chromatography*) é um sistema cromatográfico constituído por uma fase móvel (FM) líquida que flui por uma fase estacionária (FE) levando à distribuição dos solutos entre ambas as fases devido às diferenças de interação dos solutos em cada uma delas. A natureza da FE e os tipos de equilíbrios entre as fases definem cinco tipos de LC: partição, adsorção, troca-iônica, afinidade e exclusão por tamanho.

A técnica mais utilizada de LC é a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e utiliza um sistema de alta pressão (em torno de 500 bar) para bombear a FM. As colunas contendo a FE possuem até 4,6 mm de diâmetro e a FE são comumente partículas esféricas de diâmetro entre 3 e 5 µm compactadas (MALDANER; COLLINS, 2010).

### 1.2. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*) é uma técnica que utiliza um meio líquido contendo um eletrólito tamponado para separar espécies carregadas na presença de um campo elétrico que migram com velocidades eletroforéticas diferenciadas (definidas pela carga e tamanho de cada espécie). Uma característica dessa técnica é a presença de um fluxo

eletrosmótico (FEO) oriundo do arraste do solvente a partir da migração dos cátions solvatados do eletrólito em direção ao catodo (eletrodo negativo). A velocidade eletrosmótica (velocidade do FEO) é bem maior que a velocidade eletroforética e o FEO arrasta todas as espécies, incluindo as neutras, em direção ao catodo, tornando possível orientar ânions, cátions e espécies neutras para uma mesma região do capilar, possibilitando sua detecção em um ponto comum (TAVARES, 1997).

O modo de separação mais comum em CE é denominado eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), em que a concentração do tampão é constante em toda a região de separação. Ao longo dessa região, os componentes iônicos distintos se separam em zonas e os neutros permanecem em uma única zona. Esta é uma limitação desse modo, que é a incapacidade de separar espécies neutras.

Alternativamente podemos citar o modo de separação por cromatografia electrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*) em que uma pseudo-fase estacionária é obtida a partir de tensoativos que formam micelas carregadas no eletrólito. As micelas migram em direção ao detector e os analitos neutros apresentam interações de partição diferenciadas com as fases de eletrólito (hidrofílica) e pseudo-estacionária (hidrofóbica), possibilitando a separação. Entretanto, a MEKC possui algumas desvantagens que limitam a sua utilização, principalmente a limitada capacidade de picos (intervalo de tempo entre o soluto não retido e o soluto totalmente retido pela micela) e a utilização de tensoativos, que podem comprometer os sistemas de detecção por espectrometria de massas (SATINDER; MOHAMEDILIAS, 2008).

### 1.3. ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR

A eletrocromatografia capilar (CEC, *capillary electrochromatography*) é uma técnica de separação analítica que une as características da CE e da LC. Em termos práticos utiliza-se a instrumentação da CE incluindo um capilar contendo em seu interior uma FE típica das técnicas cromatográficas. Em CEC a FM contendo os analitos e o eletrólito é forçada, pela aplicação de um campo elétrico gerador do FEO, a eluir pelo capilar contendo a FE. A separação se dá

tanto pela migração com velocidade diferenciada dependente da carga e tamanho do analito, como pelas diferenças de interação dos analitos com a FE. O FEO característico da CE elimina a necessidade da aplicação de pressão para prover a eluição da FM e tem um perfil planar contrastando com o perfil parabólico do fluxo gerado por pressão. Em adição a isso, os princípios cromatográficos possibilitam a separação de moléculas neutras, o que não é possível quando se utiliza técnicas eletroforéticas como a CZE (PATERSON; BOUGHTFLOWER, 2000; SEGATO *et al.*, 2009).

#### 1.4. FASES ESTACIONÁRIAS

A FE pode ser um sólido, um líquido (adsorvido ou ligado a um sólido) ou um gel e é fixada em um suporte inerte localizado sobre uma superfície planar ou tubular, podendo o suporte ser a própria superfície ou um material particulado depositado sobre ela. No caso em que a FE está sob a forma de um material particulado compactado preenchendo o interior de um tubo, temos a denominação de coluna recheada ou coluna compactada. Quando o tubo tem sua parede interna revestida por uma camada de FE, temos a denominação de coluna tubular aberta. Além disso, a FE no interior do tubo pode ser um leito contínuo, unitário e poroso denominado coluna monolítica.

As colunas recheadas são o tipo mais utilizado em LC e o recheio é geralmente preparado a partir de partículas de sílica com diâmetros altamente uniformes recobertas com filmes orgânicos, os quais são quimicamente ou fisicamente ligados à superfície. Comumente as partículas são esferas de diâmetro entre 3 e 5  $\mu\text{m}$  compactadas em colunas de 4,6 mm de diâmetro. Já as colunas tubulares abertas requerem preferencialmente capilares com dimensões bastante reduzidas (da ordem de  $10^{-2}$   $\mu\text{m}$ ). Nesse caso, uma fina camada de FE com espessura de poucos décimos de micrometros é fixada na parede interna do capilar recobrando uniformemente o seu interior.

#### 1.4.1. Fases estacionárias monolíticas

As fases estacionárias monolíticas (FEM) podem ser definidas como um leito contínuo, unitário e poroso pelo qual elui a FM e se encontra normalmente na forma cilíndrica no interior de um tubo, daí a denominação de coluna monolítica. Embora estruturas monolíticas tenham sido anteriormente aplicadas nas ciências de separações, o primeiro aparecimento do termo "monolito" nesse sentido surgiu em 1993 na separação de proteínas em uma esponja de celulose funcionalizada. Similarmente, a expressão "monolítica" foi relacionada com polímeros rígidos macroporosos preparados por polimerização grosseira em um molde fechado e tornou-se rapidamente um padrão (SVEC *et al.*, 2003). A partir dos anos 2000 e principalmente na década atual as colunas monolíticas ganharam expressivo interesse pelo seu preparo relativamente fácil, por permitirem boa permeabilidade da FM, por possuírem elevada área superficial que propicia separações altamente eficientes e estão sendo muito bem aproveitadas nas técnicas cromatográficas miniaturizadas (WU *et al.*, 2011).

As fases estacionárias monolíticas são constituídas pelos domínios (esqueleto de sílica ou glóbulos de polímero orgânico) e longos canais que são os espaços vazios entre os domínios. É desejável que a FEM apresente grande área superficial e conseqüentemente um grande número de sítios de interação, o que permite obter elevada eficiência de separação. Isso é conseguido com a incorporação de um grande número de pequenos poros que são encontrados nos domínios da FEM. A maior contribuição para a área superficial é devida aos microporos (menores que 2 nm) e mesoporos (entre 2 e 50 nm). Já os macroporos (maiores que 50 nm) têm pouca contribuição para a área superficial, embora contribuam para a permeabilidade da FM, juntamente com os canais que possuem dimensões próximas de 1  $\mu\text{m}$ . A porosidade depende do monômero de entrecruzamento, da temperatura e do tempo de polimerização, mas principalmente do agente porogênico (FARIA *et al.*, 2006).

A facilidade de preparo se deve ao fato das fases estacionárias monolíticas poderem ser preparadas *in situ*, ou seja, diretamente no interior de tubos capilares, sem a necessidade de filtros para reter o material, pois este

pode se fixar nas paredes internas. Existem três tipos básicos de colunas monolíticas de acordo com a natureza da matriz química que pode ser baseada em sílica, baseada em polímeros orgânicos ou ser um híbrido desses dois tipos.

#### 1.4.1.1. Fases estacionárias monolíticas à base de sílica

O principal método de preparo das colunas baseadas em sílica é pelo processo sol-gel a partir da policondensação hidrocatalítica de um alcoxisilano (tetrametoxisilano, por exemplo) na presença de um polímero orgânico solúvel em água como modelador dos poros (agente porogênico). O processo se desenvolve com o ganho de viscosidade da mistura passando de um sol para um gel, acompanhado por uma separação de fases na qual o agente porogênico perde sua solubilidade no meio, formando os poros. Subsequentemente ocorre uma etapa de envelhecimento do gel com lenta evaporação do excesso de solvente no interior dos poros completando os processos de hidrólise e condensação e aumentando as interligações entre cadeias poliméricas. Por fim, é necessária uma etapa de secagem para remoção completa da fase líquida formada pelo solvente, reagentes, catalisadores e produtos de reação.

#### 1.4.1.2. Fases estacionárias monolíticas à base de polímeros orgânicos

Para as colunas baseadas em polímeros orgânicos, o preparo ocorre a partir da polimerização de um ou mais tipos de monômeros (geralmente poliestirenos, polimetacrilatos e poliácridamidas) em uma mistura contendo um agente de entrecruzamento e um iniciador de polimerização, tudo na presença de um ou dois solventes porogênicos. A polimerização é feita por adição radicalar e pode ser termoiniciada (por aquecimento) ou fotoiniciada (por radiação UV) (ZOU *et al.*, 2002). Geralmente a termoiniciada requer tempos muito maiores de polimerização. O agente porogênico atua na solvatação das cadeias poliméricas no meio reacional nos primeiros estágios da polimerização

e nesse caso a formação dos poros depende da separação de fases quando a solubilidade dos núcleos poliméricos diminui (SVEC, 2010).

#### 1.4.1.3. Fases estacionárias monolíticas híbridas

É crescente o desenvolvimento de colunas híbridas que buscam acumular características positivas das outras duas. As colunas baseadas em polímeros orgânicos são mais estáveis à variação de pH e podem apresentar uma grande diversidade de superfícies químicas possíveis de se obter devido à variedade de monômeros disponíveis para o processo de polimerização. Entretanto, sofrem desgaste mecânico devido a sucessivos intumescimentos e encolhimentos provocados por alguns solventes, gerando perda de repetibilidade nas análises nas quais são empregadas. Já as baseadas em sílica são mais resistentes a esse desgaste mecânico, mas são comprometidas em pH fora da faixa de estabilidade da sílica (pH entre 2 e 8), pois as ligações siloxanas (Si-O-Si) são mais vulneráveis ao ataque hidrolítico (em pH < 2 e pH > 8).

As colunas híbridas podem ser preparadas a partir de um alcóxissilano organofuncionalizado, como o 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano (MPTMS), por exemplo, que contém um grupo metacrilato. O MPTMS é um monômero que tem sido utilizado como modificador da parede interna do capilar para permitir a ancoragem de materiais orgânicos na parede inorgânica (POSTHUMUS; MAGUSIN, 2004). Entretanto, poucos trabalhos tratam do MPTMS como um monômero constituinte da matriz polimérica (ZHENG *et al.*, 2007). A polimerização desse tipo de monômero envolve dois processos químicos diferentes: hidrólise e condensação dos grupos alcóxissilanos (Figura 1) e polimerização dos grupos metacrilatos. Esse processo pode ser identificado como uma polimerização sol-gel (LI *et al.*, 2004). Após a policondensação dos monômeros com formação de oligômeros, a estrutura formada passa a ter vários pontos para a polimerização e reticulação a partir dos grupos metacrilatos que possuem uma ligação  $\pi$  para a adição radicalar (Figura 2) (VAZ *et al.*, 2012).

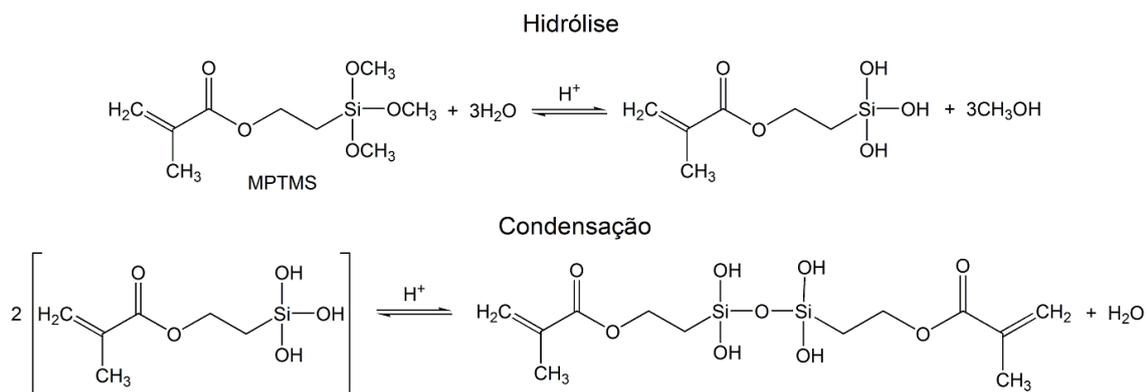


Figura 1: Etapas de hidrólise e condensação do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano levando à formação de um dímero.

Dessa forma são obtidas fases estacionárias monolíticas com ligações covalentes entre partes orgânicas e inorgânicas, como as ligações sílica-carbono (Si-C) hidroliticamente mais estáveis. A parte orgânica, constituída por grupos metil e propil, além de uma pequena quantidade de resíduos de anéis benzênicos do fotoiniciador, pode conferir à FEM características hidrofóbicas, o que levaria o sistema eletrocromatográfico a atuar como fase reversa, em que a FE é apolar e a FM polar. Além disso, esse tipo de monômero serve como uma interface entre a parede do capilar e a matriz polimérica, permitindo a ancoragem da FE (Figura 3).

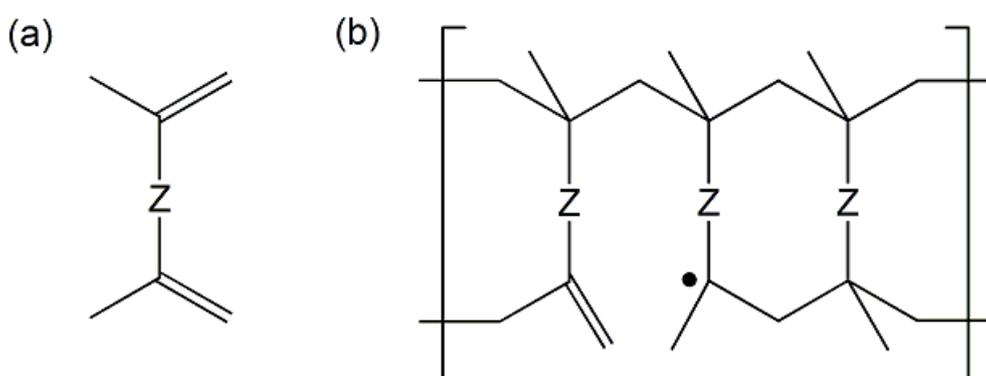


Figura 2: (a) estrutura simplificada de um dímero a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano; e (b) possível estrutura simplificada do polímero formado por adição radicalar.

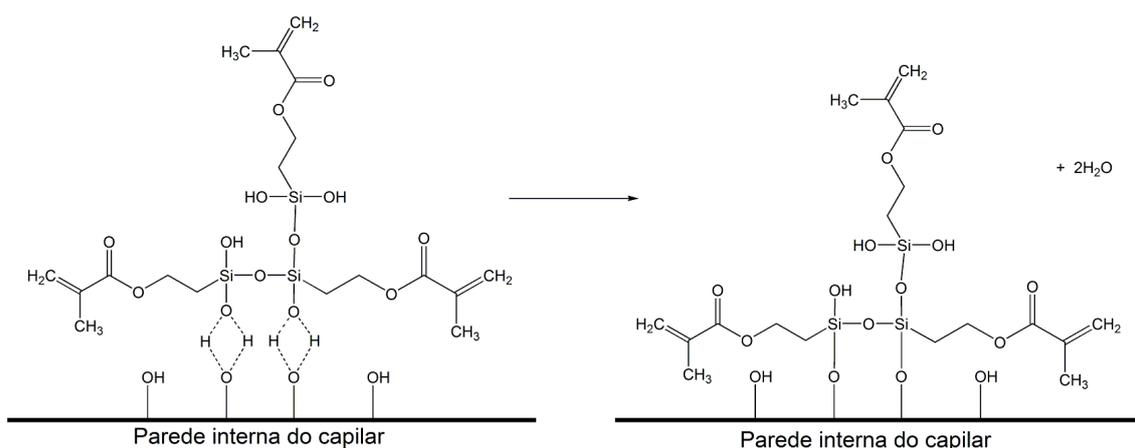


Figura 3: Esquema mostrando a ancoragem de um trímico formado a partir do 3-(metacriloxipropil)-trimetoxissilano à parede interna do capilar de sílica fundida.

#### 1.4.1.4. Capilares transparentes à radiação UV e fotopolimerização *in situ*

As fases estacionárias monolíticas podem ser produzidas pela polimerização de um monômero diretamente no interior do capilar (*in situ*) e o conjunto passa a se denominar coluna monolítica (GUSEV *et al.*, 1999). Neste trabalho foi adotado um processo de fotopolimerização iniciado pelo óxido de fenil-bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina (FMBF) que gera radicais ao absorver radiação em comprimento de onda característico (375 nm) (Figura 4). Após a geração dos radicais a polimerização se propaga por adição radicalar às ligações do tipo  $\pi$  do monômero.

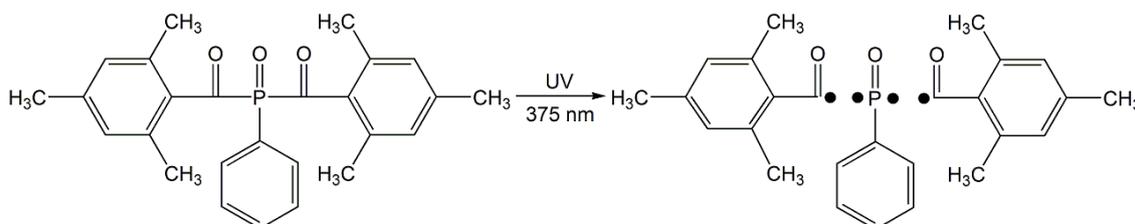


Figura 4: Formação de radicais a partir da fotólise do óxido de fenil-bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina.

A fotopolimerização *in situ* necessita que o material do capilar seja transparente à radiação utilizada na fotólise do iniciador. Os capilares de sílica fundida comumente são revestidos externamente com poliimida, que confere robustez mecânica ao capilar, mas não é transparente à radiação UV. Como alternativa, existem capilares revestidos externamente com fluoropolímero ou com poliacrilato, transparentes a uma determinada faixa da radiação UV. Capilares revestidos com poliacrilato já foram utilizados com sucesso no preparo de colunas monolíticas pelo Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (VAZ *et al.*, 2008a). No presente trabalho, além de capilares revestidos com poliacrilato foram utilizados dois tipos de capilares revestidos com fluoropolímeros (séries TSU e TSH da *Polymicro Technologies*). Ambos são transparentes à radiação UV, permitindo a fotopolimerização da FEM. O da série TSU tem transparência maior que 90% a 214 nm, região do espectro em que muitos analitos são detectados, o que elimina a necessidade de remoção do revestimento para criar uma janela óptica de detecção, sendo essa uma vantagem. Os capilares revestidos com poliacrilato e os da série TSH apresentam uma porcentagem muito pequena de transmitância da radiação em comprimentos de onda menores que 300 nm, necessitando a remoção do revestimento em uma pequena seção do capilar para inserir uma janela de detecção, tornando essa região frágil e susceptível à quebra. Esses três tipos de capilares permitem o controle visual do preenchimento do capilar com a mistura polimérica, a fotopolimerização *in situ* e a avaliação da homogeneidade macroscópica do monolito seco.

### 1.5. MINIATURIZAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Atualmente busca-se obter o melhor desempenho cromatográfico com a redução das dimensões da coluna, tanto em diâmetro quanto em comprimento, bem como a produção de partículas cada vez mais uniformes e menores. Além disso, também é conveniente a possibilidade de introdução de menores volumes de amostra, a redução do consumo de solventes, a menor geração de

resíduos e a redução significativa do tempo de análise (MUHLEN; LANÇAS, 2004).

Tanto a LC quanto a CEC estão sendo exploradas nesse sentido. Com relação à LC, não existe atualmente um consenso em relação à nomenclatura das técnicas miniaturizadas. No entanto, (CHERVET *et al.*, 1996) sugeriu uma nomenclatura levando em consideração a vazão da FM e o diâmetro interno da coluna conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação de técnicas de cromatografia a líquido segundo CHERVET *et al.* (1996).

<b>Diâmetro interno da coluna (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Vazão da FM (<math>\mu\text{L}/\text{min}</math>)</b>	<b>Nomenclatura</b>
3200-4600	500-2000	HPLC convencional
1500-3200	100-500	HPLC microbore
500-1500	10-100	Micro-LC
150-500	1-10	LC capilar
10-150	0,01-1	Nano-LC

Embora seja possível obter colunas recheadas com partículas de diâmetros inferiores à 2  $\mu\text{m}$  e utilizar colunas tubulares abertas em capilares de dimensões bastante reduzidas, alguns obstáculos são encontrados. Um deles é o aumento da resistência ao fluxo da FM devido à redução da permeabilidade com o uso de partículas muito pequenas, que acaba por gerar elevada pressão de retorno que pode danificar a coluna e até o restante do equipamento. Nesse contexto, a CEC é uma técnica que vem ganhando espaço, pois a FM é movimentada por um FEO que elimina o problema de pressão de retorno gerada nos equipamentos de LC, mas ainda sim existe outra dificuldade que está no próprio enchimento do capilar com material particulado, gerando o inconveniente de se ter que criar filtros para reter as partículas no interior do capilar, favorecendo a perda de reprodutibilidade e formação de bolhas em análises por CEC. No caso das colunas tubulares abertas, a dificuldade está em obter filmes de FE com espessura uniforme ao longo de toda a parede do capilar.

Tendo em vista essas dificuldades, as colunas monolíticas têm sido bastante empregadas nas separações cromatográficas por apresentarem algumas características interessantes, como preparo relativamente fácil, boa permeabilidade da fase móvel e área superficial capaz de propiciar separações altamente eficientes. (FARIA *et al.*, 2006; HILDER *et al.*, 2004).

## 1.6. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os HPAs são compostos neutros constituídos apenas por carbono e hidrogênio e formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados. Por se tratarem de moléculas neutras, têm sido utilizados na avaliação de fases estacionárias monolíticas em CEC. (BERNABÉ-ZAFÓN *et al.*, 2010; DABEK-ZLOTORZYNSKA *et al.*, 2008; DING *et al.*, 1997; GARGUILO *et al.*, 2000; OU *et al.*, 2010). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA: *United States Environmental Protection Agency*) estabeleceu uma lista de dezesseis HPAs considerados prioritários para monitoramento ambiental, em função de sua carcinogenicidade e ocorrência. Dentre eles podemos citar o naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, criseno e benzo[a]pireno (Figura 5) que foram utilizados neste trabalho.

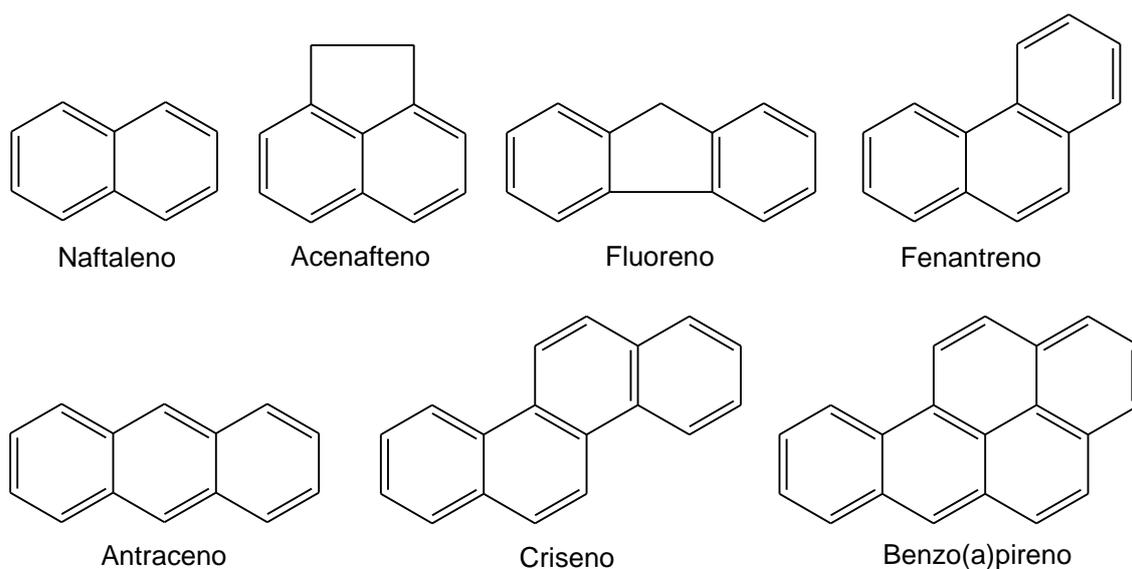


Figura 5: Estrutura e nome dos sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizados neste trabalho.

## 1.7. HORMÔNIOS ESTEROIDES

Os esteroides pertencem a um grupo de substâncias com um núcleo estrutural formado pelo ciclopenta[*a*]perhidrofenantreno e possuem um importante papel na fisiologia humana. Alguns deles atuam como hormônio sexual, dentro os quais podemos citar o estriol, o estradiol e a progesterona (Figura 6), responsáveis pelos caracteres sexuais e por dar suporte à reprodução. Com exceção de alguns esteroides com um grupo OH fenólico, como o estriol e o estradiol, a maioria dos esteroides são compostos neutros, como a progesterona (SILVA *et al.*, 2007).

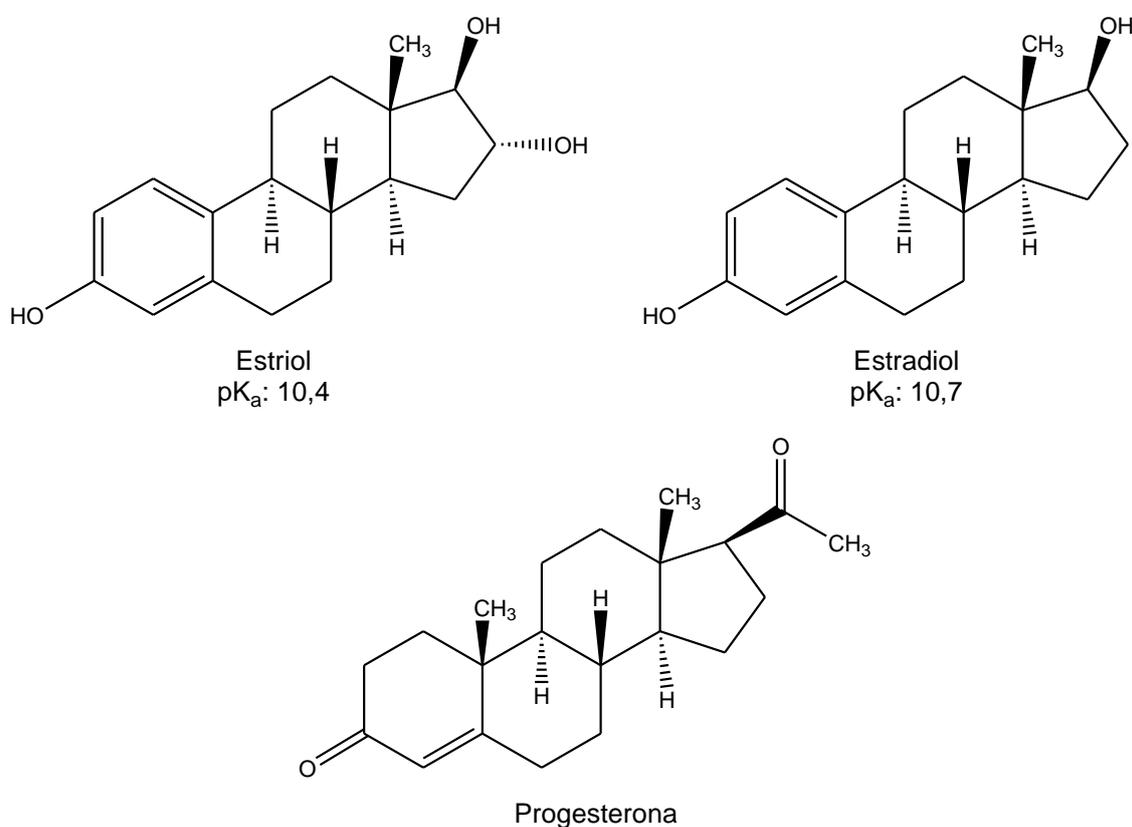


Figura 6: Estrutura e nome dos três esteroides utilizados neste trabalho.

Além da importância em se quantificar esses hormônios em fluidos biológicos a fim de se obter um parecer clínico, diversas formulações farmacêuticas têm sido desenvolvidas para a reposição hormonal de pacientes na menopausa, objetivando o alívio dos sintomas vasomotores, tratamento da atrofia vaginal e prevenção da osteoporose, sendo necessário manter um

rigoroso controle de qualidade dessas formulações. O uso desses esteroides pode ser isolado ou em associação de um ou mais. A associação entre estrogênios (como estriol ou estradiol) e progestogênios (como a progesterona) tem sido recomendada para as mulheres que já passaram pela menopausa e que possuem útero, pois o progestogênio limita a hiperplasia do endométrio acentuada pelo uso de estrogênio. Em outros casos, o uso isolado de estrogênios é recomendado (GIACOMINI *et al.*, 2006). Em adição a isso, com o aumento do uso dessas formulações, o seu descarte inapropriado e até mesmo a excreção de tais substâncias e seus metabólitos pelo organismo têm se tornado um problema ambiental por contaminar principalmente ambientes aquáticos e sua fauna, causando, por exemplo, distúrbios sexuais em peixes (TOMŠÍKOVÁ *et al.*, 2012; YING *et al.*, 2002)

A análise de esteroides tem sido possível a partir de técnicas de separação analítica tais como CZE (BRITZ-MCKIBBIN *et al.*, 2003), MEKC (FLOR *et al.*, 2010), CEC (JIN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010) e HPLC (BOCIAN *et al.*, 2012). Todavia é comum o uso de sistemas complexos de eletrólitos, adição de surfactantes, derivatização e ionização dos esteroides, elevado consumo de solventes, produção complexa de fases estacionárias com misturas de monômeros e funcionalizadas com uma variedade de substâncias. No presente trabalho foi possível separar três esteroides em sua forma neutra por CEC utilizando uma FEM de preparo simples e uma FM constituída apenas por um único eletrólito e um solvente orgânico para controlar a polaridade.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma FEM produzida a partir da polimerização fotoiniciada do monômero (3-metacriloxipropil)-trimetoxissilano em capilares de sílica fundida com revestimento externo de fluoropolímero transparente à radiação UV, buscando responder se esse tipo de capilar é adequado para o preparo da FEM e se esta pode ser usada na separação por CEC de três hormônios esteroides (estriol, estradiol e progesterona) como promissora alternativa para análise de amostras de gel transdérmico contendo esses analitos.

Paralelamente buscou-se avaliar alguns parâmetros experimentais tais como pressurização do sistema durante a corrida e renovação da FM entre as corridas como forma de reduzir a formação de bolhas e minimizar os efeitos provocados pela eletrólise da FM - problemas comuns em análises envolvendo CEC.

Como objetivo secundário, a FEM foi testada como promissora coluna capilar envolvendo técnicas de LC.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES, PADRÕES E AMOSTRAS

Nas etapas de pré-tratamento do capilar e preparo da FEM foram utilizados: ácido clorídrico supra puro - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); hidróxido de sódio P.A. - Labsynth (Diadema, Brasil); metanol P.A. - Quimex (Tubarão, Brasil); (3-metacriloxipropil)-trimetoxisilano - Acros Organics (New Jersey, EUA); óxido de fenil-bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina - Aldrich (Steinheim, Alemanha); tolueno - Beckman (Fullerton, EUA). Para o preparo da FM: acetonitrila e NH<sub>4</sub>Ac P.A. - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os padrões utilizados foram: naftaleno, acenafteno (99,0%) e benzo[a]pireno (96,0%) - Sigma (Saint Louis, EUA); antraceno (99,0%) e fenantreno (97,0%) - Fluka (Buchs, Suíça); criseno e fluoreno (98,0%) - Aldrich (Steinheim, Alemanha); tiouréia P.A. - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Padrões secundários de estriol, estradiol e progesterona foram cedidos e rotulados em frascos âmbar pela Ortofarma (Matias Barbosa, Brasil). Amostras de gel transdérmico manipulado contendo associação de estriol e estradiol foram igualmente cedidos pela Ortofarma.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água tratada pelo sistema de osmose reversa utilizando o Aparelho de Osmose Reversa - Q842 da Quimis (Diadema, Brasil).

#### 3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados capilares de sílica fundida revestidos externamente com poliacrilato obtidos do Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (Araraquara, Brasil) e também capilares revestidos externamente com polímeros fluoretados das séries TSU e TSH da Polymicro Technologies (Phoenix, EUA). As dimensões dos capilares foram: 100 µm de diâmetro interno, 360 µm de diâmetro externo e 37 cm de comprimento.

Para o processo de acondicionamento do capilar e seu preenchimento com a solução fotopolimerizável foram utilizadas seringas *Gastight* (25  $\mu$ L-1702-RNR e 50  $\mu$ L-1705-TLL) - Hamilton Company (Reno, EUA); uniões do tipo *MicroTight*<sup>®</sup> (P-720 e P-662) - Upchurch Scientific (Oak Harbor, EUA); e um dispositivo de preenchimento a alta pressurização (DAP) – Figura 7 – desenvolvido no Laboratório do Núcleo de Espectroscopia de Materiais do Departamento de Física da UFJF.

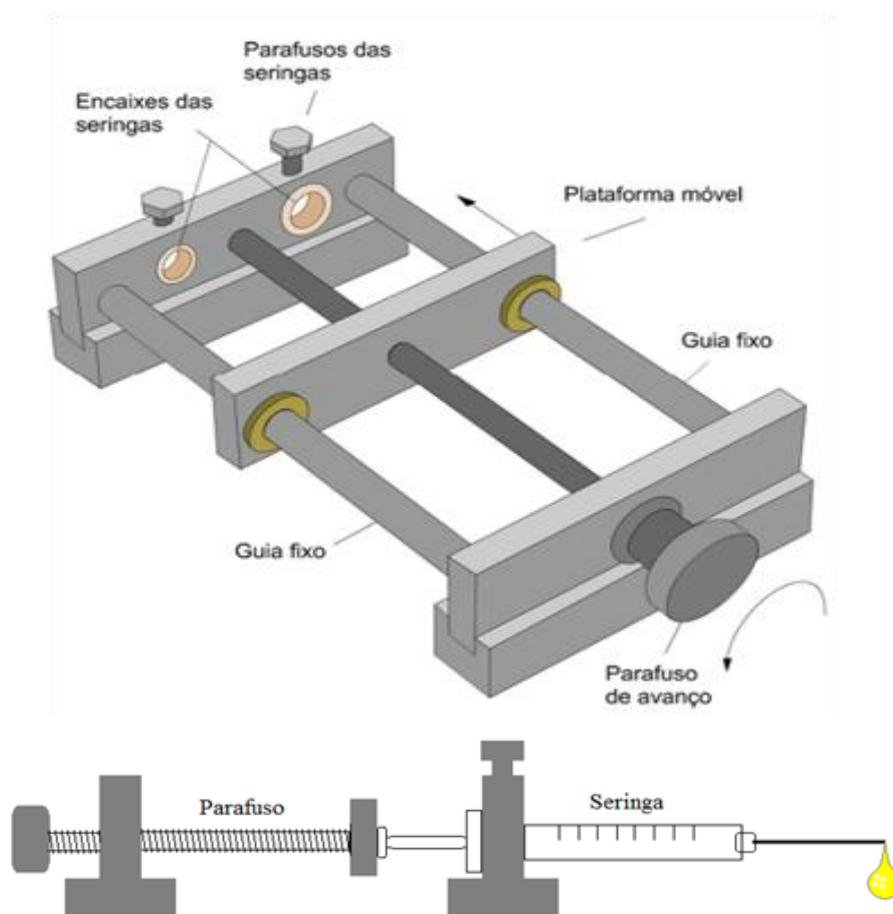


Figura 7: Dispositivo de preenchimento a alta pressurização.

A fotopolimerização foi realizada em um reator fotoquímico equipado com 6 lâmpadas negras de 15 W cada e com emissão predominante em 375 nm desenvolvido pelo GQAQ (VAZ *et al.*, 2008b).

Dois equipamentos de CE da Agilent Technologies, modelos 1600 e 7100, foram utilizados nas análises. Ambos equipados com fonte de alta tensão ( $\pm 30$  kV), sistema de detecção com arranjo de diodos (DAD), controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programa

para controle, aquisição e tratamento de dados *3D-CE ChemStation* – Rev. A.10.02 (modelo 1600) e Rev. B.04.03 (modelo 7100). Foi instalado no aparelho um cilindro de gás nitrogênio ultrapuro - White Martins (Juiz de Fora, Brasil) para permitir aplicação de pressões entre de 2 e 12 bar.

Um equipamento *Rapid Resolution Liquid Chromatography* (RRLC) da Agilent Technologies, modelo 1200, disponível no Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica Aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, coordenado pelo professor Dr. Ricardo Queiroz Aucélio, foi utilizado na tentativa de se adotar as colunas monolíticas como FE em cromatografia líquida.

### 3.3. PREPARO DAS COLUNAS MONOLÍTICAS

As colunas monolíticas foram todas produzidas seguindo o procedimento descrito por VAZ *et al.* (2012) que está simplificado no fluxograma da Figura 8. Inicialmente os capilares de sílica fundida foram submetidos a um pré-tratamento para ativação dos grupos silanóis da parede interna. Esse preparo consiste na passagem de fluxos sequenciais de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>, HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e metanol, nessa ordem, durante 30 minutos cada. Nessa etapa, a união *MicroTight*® P-662 foi utilizada para conectar o capilar à seringa *Gastight* 1705-TLL de 50 µL cujo o êmbolo foi pressurizado pelo DAP fazendo fluir pelo capilar a solução contida em seu interior. Após essa etapa, o interior do capilar foi seco pela passagem de ar.

A composição da solução fotopolimerizável, que dá origem à FEM após a polimerização, está relatada na Tabela 2. O MPTMS foi misturado ao HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com 10 minutos de agitação, dando origem à solução monomérica. O FMBF (fotoiniciador) foi solubilizado em tolueno, com agitação de 5 minutos, originando a solução porogênica. As soluções monomérica e porogênica foram misturadas, com agitação de 30 minutos, para obtenção da solução fotopolimerizável. Esta última foi centrifugada (6000 rpm por 1 min) para separação da fase orgânica a qual é utilizada na polimerização. Todos os processos de agitação foram feitos no escuro e a solução fotopolimerizável armazenada em frasco âmbar envolto por papel alumínio.

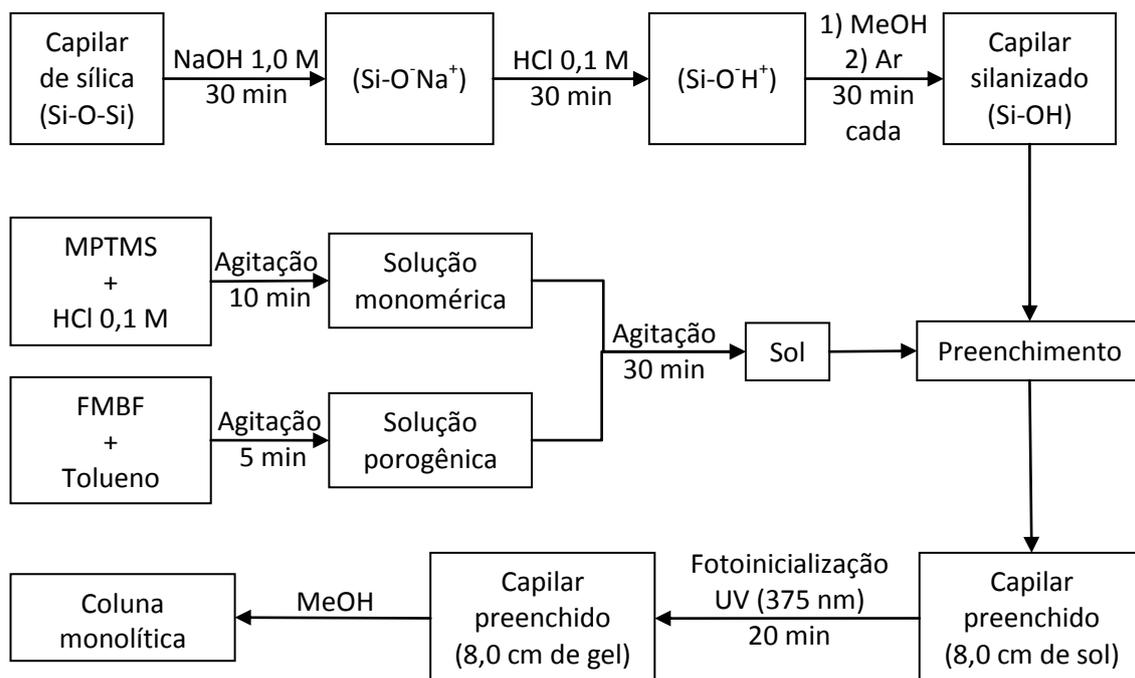


Figura 8: Fluxograma do processo de produção das colunas monolíticas.

Tabela 2: Composição da solução fotopolimerizável.

Componente da mistura	Proporção
H <sub>2</sub> O (mol <sub>H<sub>2</sub>O</sub> / mol <sub>MPTMS</sub> )*	4
Tolueno (% v/v)**	80
Fotoiniciador (% m/m)***	3,5

Obs.: \*razão molar entre a água da solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e o MPTMS; \*\*porcentagem de tolueno sobre a solução monomérica; \*\*\*porcentagem de massa do fotoiniciador sobre a massa de MPTMS.

A introdução da solução fotopolimerizável no capilar foi feita com o DAP e controlada visualmente até que a solução ocupasse a porção desejada. Para as análises por CEC, essa porção corresponde a 8,0 cm a partir de uma das extremidades. Para os testes envolvendo o equipamento de LC, diversos tamanhos de capilares de 8,0 a 30,0 cm foram totalmente preenchidos. Nessa etapa, foi utilizada a união *MicroTight*® P-720 para conectar o capilar à seringa *Gastight* 1702-RNR de 25 µL.

Depois de preenchido, o capilar foi colocado no reator fotoquímico permanecendo por 20 minutos. Após esse período, o porogênio e resíduos da reação de polimerização foram removidos do capilar com a passagem de fluxo de metanol.

No caso do capilar revestido com poliacrilato e naquele revestido com fluoropolímero da série TSH, foram criadas janelas de detecção com a remoção por queima do revestimento logo ao fim da coluna monolítica (8,5 cm a partir da extremidade em que o capilar foi preenchido). O capilar com revestimento de fluoropolímero da série TSU não necessita de remoção do revestimento para a janela de detecção. Também não é necessário criar uma janela de detecção para as colunas testadas em LC.

#### 3.4. PROCEDIMENTO PARA ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR

Foram realizados testes envolvendo misturas padrões tanto de HPAs (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno) quanto de hormônios esteroides (estriol, estradiol e progesterona). Em ambos os casos os padrões foram solubilizados em metanol. As concentrações utilizadas bem como as condições de corrida e composição da FM estão indicadas nas legendas das figuras correspondentes a cada eletrocromatograma obtido e discutido no item 4 (Resultados e Discussões) deste trabalho.

Também foi realizado um teste com amostra de gel transdérmico manipulado contendo uma associação entre estriol e estradiol. A extração dos analitos foi feita com 5,0 mL de metanol para aproximadamente 1,0 g de amostra. Após 3 minutos de agitação em vórtex, 2 minutos de banho de ultrassom e mais 3 minutos de agitação em vórtex, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e filtrada em filtros de 0,45 µm.

##### 3.4.1. Injeção

Foi utilizado o modo de injeção descrito na literatura como *short-end injection* (EUERBY *et al.*, 1998; MICKE *et al.*, 2009) em que a extremidade do

capilar localizada na posição de saída convencional do equipamento de CE (*outlet*) é considerada como o início do sistema eletrocromatográfico e é utilizada como entrada de FM e amostra (Figura 9). Dessa forma, na implementação do método no *software* do equipamento de CE, deve ser informada a posição de injeção. A polaridade também deve ser invertida com aplicação de voltagem negativa para que o sentido do fluxo seja do *outlet* para o *inlet* nesse caso. Nesse modo de injeção, o sistema de detecção passa a se localizar a 8,5 cm do início do capilar e o preparo de capilares com 8,0 cm de FEM torna-se adequado.

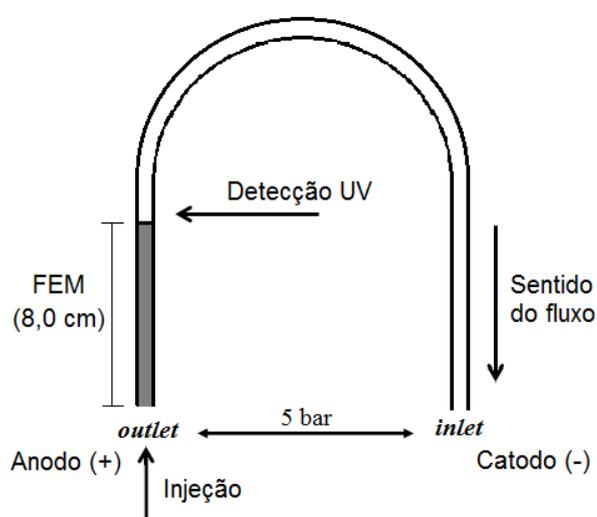


Figura 9: Esquema do modo *short-end injection* mostrando também a pressurização dos *vials*.

#### 3.4.2. Utilização do sistema de pressão externa

A coluna monolítica no interior do capilar oferece resistência à passagem de fluxo de FM, soluções ou solventes. Pressões convencionais do equipamento de CE (da ordem de  $10^{-3}$  bar) não são suficientes para vencer essa resistência e dessa forma o sistema de alta pressurização externa do equipamento deve ser utilizado. O equipamento pode operar em dois modos distintos de pressurização externa (*CEC* e *CE+p*). Em ambos os modos, a pressão externa pode ser utilizada para o pré-condicionamento do capilar pela

função *highpressure*. Nesse caso, pressões de 5 bar foram aplicadas sobre o *vial* localizado no *outlet*. Nesse trabalho foi utilizado o modo *CEC* que permite ainda a pressurização simultânea de ambos os *vials* durante as corridas e nesse caso também foram aplicadas pressões de 5 bar.

### 3.4.3. Condicionamento e limpeza da coluna

Antes da primeira corrida de cada análise foi feita a limpeza da coluna com fluxo de metanol (5 min) juntamente com o pré-condicionamento da coluna com fluxo de FM (20 min). Entre as corridas, foi adotado o condicionamento com fluxo de FM (5 min). Após as análises, a limpeza da coluna foi feita com fluxo de acetonitrila (10 min) e depois fluxo de metanol (10 min). Em todos os casos o fluxo foi gerado pela aplicação de 5 bar de pressão externa sob o *vial outlet*.

## 3.5. PROCEDIMENTO PARA CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

As colunas monolíticas com dimensões variando entre 8,0 e 30,0 cm foram submetidas a corridas cromatográficas de uma mistura de HPAs contendo fenantreno, criseno e benzo[a]pireno solubilizados em acetonitrila para uma concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Os comprimentos de onda utilizados na detecção foram 250, 270 e 300 nm. Fases móveis com diversas proporções entre água e acetonitrila foram testadas com vazões variando entre 0,05 e 0,15 mL/min.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. COLUNA MONOLÍTICA EM ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR

#### 4.1.1. Avaliação preliminar baseada na separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

O passo inicial para avaliar o potencial de utilização de capilares revestidos com fluoropolímero como suporte para FEM foi a comparação entre colunas produzidas nesse tipo de capilar e colunas produzidas em capilar revestido com poliacrilato. As colunas produzidas foram testadas na separação de uma mistura padrão de cinco HPAs (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol). Para tanto, as seguintes condições de corrida foram utilizadas: FM composta por  $\text{NH}_4\text{Ac}$   $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,0 (60% v/v) e por acetonitrila (40% v/v); tiouréia  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  como marcador de fluxo; voltagem de -20 kV; temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção hidrodinâmica a -25 mbar por 5 s; e detecção a 220 nm (naftaleno e acenafteno) e 250 nm (antraceno, fenantreno e fluoreno). Essas condições foram escolhidas a partir do trabalho de (VAZ, F. *et al.*, 2012).

A Figura 10 mostra os eletrocromatogramas da mistura dos cinco HPAs utilizando uma coluna monolítica produzida em capilar revestido externamente com fluoropolímero TSU (Figura 10A) e com poliacrilato (Figura 10B). Apesar das diferenças no tempo total de análise necessário para separar os cinco HPAs, podemos notar visualmente que a ordem de eluição é a mesma e a separação entre os picos é bem semelhante entre as duas colunas produzidas em capilares de tipos diferentes de revestimento externo. Além disso, não houve diferenças significativas na intensidade dos picos. Isso mostra que o capilar com revestimento de fluoropolímero não altera as características da FEM, podendo ser empregado tão bem quanto o com revestimento de poliacrilato para a FEM desenvolvida pelo GQAQ.

A variação ocorrida no tempo total de análise pode ser justificada pelo fato de haver diferenças de transmitância da radiação entre os dois tipos de

revestimento durante o processo de fotopolimerização da FEM, bem como variações no diâmetro interno dos capilares, principalmente no revestido com poliacrilato, em que o fabricante informa variações de até  $\pm 15 \mu\text{m}$ . Isso pode trazer variações, por exemplo, no número de poros e alterar a permeabilidade da coluna, entretanto, as características de interação com os analitos permanecem as mesmas.

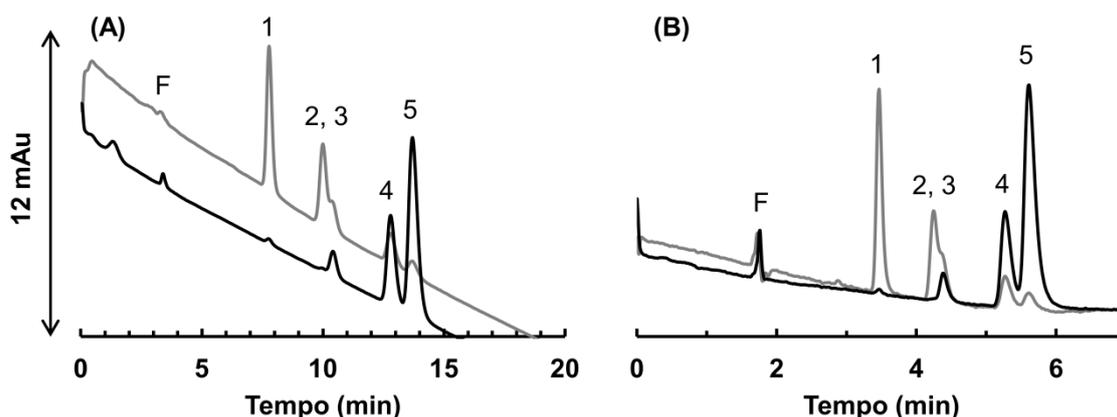


Figura 10: Eletrocromatogramas obtidos em (A) uma coluna produzida em capilar TSU e (B) uma coluna produzida em capilar revestido com poliacrilato. Ordem de eluição: (F) tiouréia, (1) naftaleno, (2) acenafteno, (3) fluoreno, (4) fenantreno e (5) antraceno, diluídos em metanol a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . FM:  $\text{NH}_4\text{Ac}$   $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  (60%) e acetonitrila (40%); voltagem:  $-20 \text{ kV}$ ; temperatura:  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção:  $-25 \text{ mbar}$  por  $5 \text{ s}$ ; detecção:  $220 \text{ nm}$  (linha cinza) e  $250 \text{ nm}$  (linha preta).

Assim, o capilar revestido com fluoropolímero foi considerado adequado como suporte para a FEM e foi adotado na sequência do trabalho por ser mais resistente à quebras e à solventes, ser transparente à radiação utilizada na detecção dos analitos e possuir melhor padronização do diâmetro interno, quando comparado ao capilar revestido com poliacrilato.

O acenafteno difere do fluoreno apenas pela posição em que os anéis estão condensados, mas esse fato já é suficiente para que entre eles haja uma separação pela FEM. O mesmo acontece entre o antraceno e o fenantreno. Esses dois últimos, ambos com cadeia carbônica de três anéis benzênicos, correspondem aos analitos mais apolares. A ordem de eluição sugere um comportamento do sistema típico de fase reversa em que os analitos com

característica mais apolar eluem por último, pois interagem mais com a FEM. Essa possui características hidrofóbicas, como foi observado em um experimento em que uma fração do polímero foi mergulhada em um béquer contendo água. O polímero claramente não interagiu com a água e foi repelido por essa, sendo impossível sua submersão até que uma fração de acetonitrila fosse adicionada. A hidrofobicidade da FEM produzida a partir do MPTMS pode estar relacionada à parte orgânica do polímero, constituída por grupos metil e propil, além de uma pequena quantidade de resíduos de anéis benzênicos do fotoiniciador.

Esse resultado aponta para a potencialidade da FEM em separar moléculas neutras sem a necessidade de ionização, condição que não é possível em análises por CZE. Essa separação é possível em CEC devido à interação dos analitos com a FEM.

#### 4.1.2. Separação de hormônios esteroides

##### 4.1.2.1. Teste preliminar para estriol, estradiol e progesterona

Para verificar o comportamento de uma mistura de três esteroides (estriol, estradiol e progesterona a  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol) frente à técnica de CEC utilizando a FEM, um teste preliminar foi feito usando as mesmas condições de corrida da separação de HPAs, excetuando-se pelos comprimentos de onda de detecção que foram 214 e 247 nm.

Na corrida de um branco, como pode ser observado no eletrocromatograma da Figura 11A, existe um pico do sistema, além do pico do fluxo, por volta de 3 minutos de corrida, observável apenas a 214 nm. Na corrida da mistura, esse pico é sobreposto pelos picos dos analitos, conforme mostra o eletrocromatograma da Figura 11B. Além disso, não há uma separação adequada dos analitos e um dos picos sai bem próximo ao pico do FEO.

Apesar dos esteroides possuírem um núcleo cíclico semelhante ao do fenantreno com três anéis de seis carbonos, além de um anel ciclopentano,

eles possuem grupos em sua estrutura que lhes permitem ter uma interação maior com a FM. Assim, a mesma proporção de acetonitrila utilizada na análise de HPAs (40% v/v) não permite o mesmo nível de retenção.

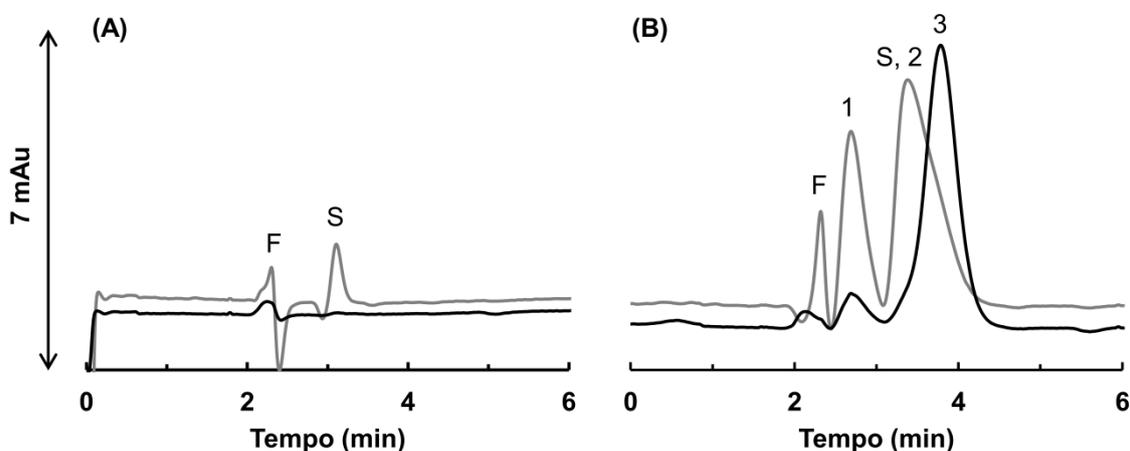


Figura 11: Eletrocromatogramas obtidos na injeção de (A) metanol (branco); e (B) mistura de estriol  $1,20 \text{ mmol L}^{-1}$ , estradiol  $1,52 \text{ mmol L}^{-1}$  e progesterona  $1,14 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol. Picos: F - fluxo; S - sistema; 1, 2 e 3 - analitos. FM:  $\text{NH}_4\text{Ac } 16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  (60% v/v) e acetonitrila (40% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura:  $20^\circ\text{C}$ ; injeção: -25 mbar por 5 s; detecção: 214 nm (linha cinza) e 247 nm (linha preta). Capilar TSU.

#### 4.1.2.2. Planejamento fatorial para algumas condições de corrida

Em busca de se obter a separação simultânea dos três esteroides em uma mistura de padrões, foi feito um planejamento fatorial  $2^3$  (dois níveis e três fatores) para o estudo de três fatores: porcentagem de acetonitrila na FM, concentração de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  na porção aquosa da FM e voltagem aplicada durante as corridas. A variação na porcentagem de acetonitrila foi escolhida por ter influência na polaridade da FM e conseqüentemente no nível de interação do analito com a mesma. A concentração de eletrólito e a voltagem influenciam na velocidade do FEO. Essas variáveis podem afetar tanto o tempo de análise quanto o perfil de separação.

Esse tipo de planejamento permite fazer uma varredura e selecionar quais variáveis são mais influentes no perfil de separação dos analitos

utilizando uma quantidade mínima de experimentos. Uma investigação multivariada é necessária, pois nesse caso podem haver interações entre os fatores e o resultado deixa de ser óbvio. O planejamento fatorial utilizado teve um caráter exploratório, onde os perfis de separação foram avaliados qualitativamente.

Os níveis utilizados em cada fator foram escolhidos por estarem nas vizinhanças da condição do teste preliminar e estão exibidos na Tabela 3. A construção do planejamento consistiu em montar uma matriz com todas as combinações possíveis entre os níveis, gerando um total de 8 ensaios.

Os valores experimentais utilizados em cada ensaio estão na Tabela 4. Cada ensaio foi realizado em duplicata totalizando 16 corridas no equipamento de CE. A sequência de execução das corridas foi aleatória e escolhida através de sorteio.

Esse planejamento exploratório permitiu obter resultados qualitativos interessantes. Por uma análise visual dos eletrocromatogramas da Figura 12, podemos verificar que dentre os fatores do planejamento o que mais influencia no perfil de separação é a porcentagem de acetonitrila, enquanto que a concentração do eletrólito parece não ter influência significativa. Já a voltagem de -25 kV permitiu corridas mais rápidas.

Tabela 3: Planejamento fatorial  $2^3$ .

Ensaio	Fator		
	Acetonitrila (% v/v)*	NH <sub>4</sub> Ac (mmol L <sup>-1</sup> )**	Voltagem (kV)
<b>A</b>	50	20	-25
<b>B</b>	50	20	-20
<b>C</b>	50	10	-25
<b>D</b>	50	10	-20
<b>E</b>	30	20	-25
<b>F</b>	30	20	-20
<b>G</b>	30	10	-25
<b>H</b>	30	10	-20

Obs.: \*porcentagem em relação ao volume total de FM; \*\*concentração na fase aquosa.

Tabela 4: Valores experimentais para cada ensaio do planejamento.

Ensaio	Fatores			
	Acetonitrila (mL)	NH <sub>4</sub> Ac* (mL)	Água (mL)	Voltagem (kV)
<b>A</b>	2,5	1,0	1,5	-25
<b>B</b>	2,5	1,0	1,5	-20
<b>C</b>	2,5	0,5	2,0	-25
<b>D</b>	2,5	0,5	2,0	-20
<b>E</b>	1,5	1,4	2,1	-25
<b>F</b>	1,5	1,4	2,1	-20
<b>G</b>	1,5	0,7	2,8	-25
<b>H</b>	1,5	0,7	2,8	-20

Obs.: volume final de 5,0 mL de fase móvel; \*solução estoque a 50 mmol L<sup>-1</sup>.

Nos quatro primeiros ensaios do planejamento, em que a porcentagem de acetonitrila é de 50% v/v, não há uma separação adequada e os três analitos coeluem com o fluxo. Em contrapartida, nos quatro últimos ensaios, com 30% v/v de acetonitrila, já é possível obter uma separação com suficiente resolução entre todos os picos. Levando em consideração que os esteroides possuem um caráter apolar, o aumento da fração aquosa na FM faz com que os analitos interajam por mais tempo com a FEM de característica hidrofóbica, retardando a migração em relação ao FEO.

A Tabela 5 mostra os valores calculados de resolução entre os picos que aparecem nos eletrocromatogramas dos ensaios com 30% de acetonitrila. Segundo SKOOG *et al.* (1997, p. 890), uma resolução de 1,5 ou superior fornece uma separação essencialmente completa. Somente a resolução entre o pico do estriol e do sistema apresentou valores maiores do que 1,5. Todavia, os demais valores são considerados satisfatórios, pois valores acima de 1,0 apresentam menos de 4% de sobreposição entre os picos.

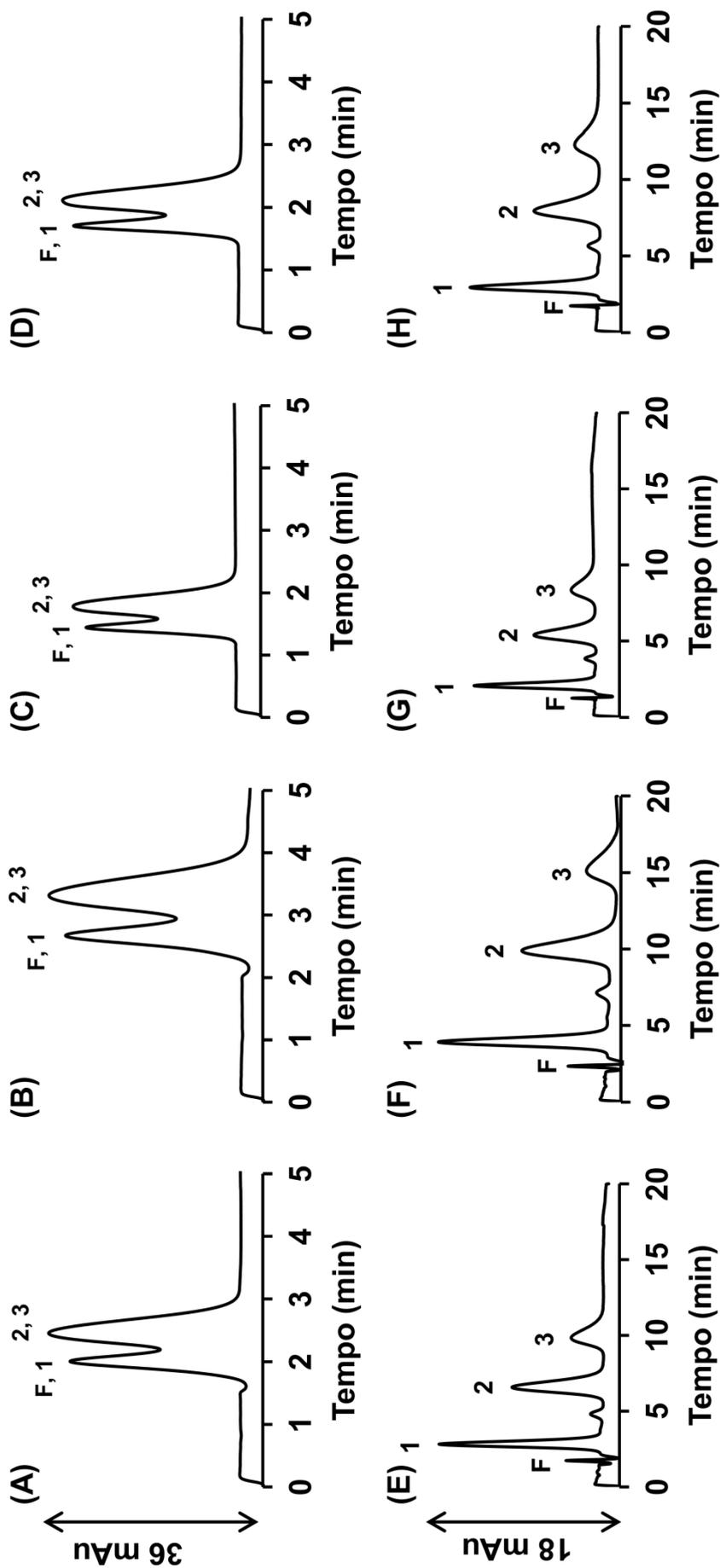


Figura 12: Eletrocromatogramas de uma das réplicas de cada ensaio do planejamento fatorial da Tabela 4. Concentração dos analitos: estradiol 4,03 mmol L<sup>-1</sup>; estradiol 4,33 mmol L<sup>-1</sup>; e progesterona 5,07 mmol L<sup>-1</sup> em metanol. Condições de análise conforme Tabela 3. Temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; detecção: 214 nm. Capilar TSU

Tabela 5: Valores médios de resolução entre os picos para os ensaios com 30% v/v de acetonitrila.

Ensaio	R <sub>F,1</sub>	R <sub>1,S</sub>	R <sub>S,2</sub>	R <sub>2,3</sub>
E	1,3	1,7	1,2	1,3
F	1,4	2,0	1,2	1,3
G	1,3	1,9	1,1	1,1
H	1,4	2,2	1,2	1,3

Obs.:  $R_{AB} = 2(t_{RB} - t_{RA}) / (W_A + W_B)$ , onde  $R_{AB}$ : resolução entres os picos A e B;  $t_R$ : tempo de retenção;  $W$ : largura do pico; A - pico do analito menos retido; e B - pico do analito mais retido. Picos: F - fluxo; S - sistema; 1, 2 e 3 - analitos.

A ordem de eluição, comprovada pela análise de solução padrão individual de cada esteroide (Figura 13), aponta para a natureza hidrofóbica da FEM e para a atuação do sistema como fase reversa, em que o analito mais apolar, a progesterona, elui por último. No caso dos outros dois analitos, a presença de um grupo OH a mais faz com que o estriol seja o mais hidrofílico e elua primeiro por interagir mais com a FM aquosa. Cabe ressaltar que o pKa do estriol e do estradiol são 10,4 e 10,7 (HUWITZ; LIU, 1977), respectivamente, e no pH da FM (pH 7,0) essas substâncias encontram-se não ionizadas, bem como a progesterona, naturalmente neutra. Assim, a separação ocorre estritamente pela interação da FEM com os analitos, não sendo necessária a ionização desses.

Apesar do aumento da voltagem permitir análises mais rápidas, existe uma limitação com relação à corrente elétrica gerada. Em CEC, correntes elétricas elevadas podem propiciar uma elevação de temperatura (efeito Joule) difícil de ser dissipada devido à presença do polímero no interior do capilar e danos ao monolito e formação de bolhas que levam a quedas de correntes elétricas são comuns. Todavia, controlando os valores de corrente pelas condições da FM, esse problema pode ser evitado. Nesse sentido, concentrações de eletrólito menores evitam correntes elétricas elevadas, como podemos observar na Tabela 6 que mostra valores menores de corrente elétrica quando se utilizou  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Ac}$ . Em outros experimentos foi observado que danos à coluna ocorrem comumente em correntes acima de  $100 \mu\text{A}$ .

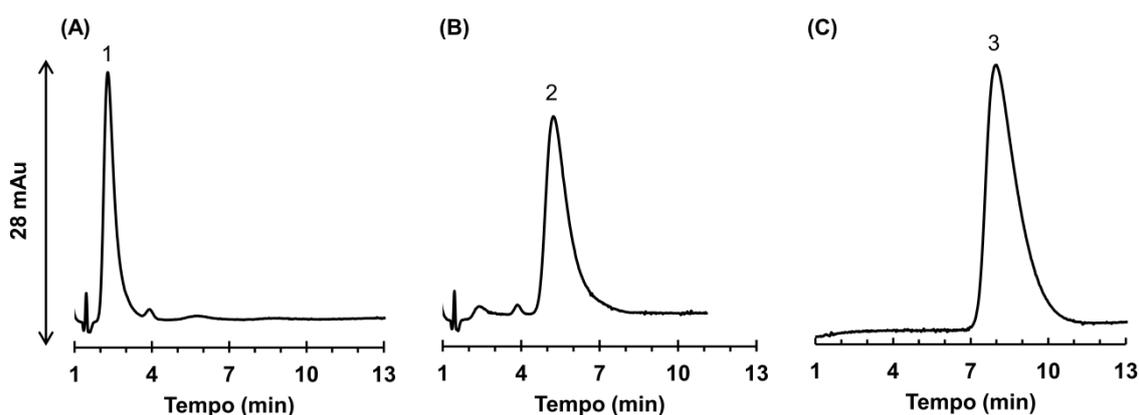


Figura 13: Eletrocromatogramas obtidos na injeção de (A) estriol  $12,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (B) estradiol  $13,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; e (C) progesterona a  $15,2 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol. Picos: 1 - estriol; 2 - estradiol; e 3 - progesterona. Condição do ensaio F:  $\text{NH}_4\text{Ac } 20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura:  $20^\circ\text{C}$ ; injeção: -25 mbar por 15 s; detecção: 214 nm (estriol e estradiol) e 247 nm (progesterona). Capilar TSU.

Tabela 6: Valores médios das correntes médias\* obtidas nos ensaios do planejamento.

Ensaio	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Ensaio	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
A	52	E	84
B	39	F	61
C	25	G	38
D	19	H	29

Obs.: \*corrente média ao longo do tempo total de corrida.

Considerando as discussões anteriores, o planejamento fatorial aponta para a condição G como uma boa escolha por propiciar análises mais rápidas, suficiente separação entre os picos e menores valores de corrente elétrica. Além disso, a eficiência de uma coluna na separação de determinado analito pode ser avaliada pelo número de pratos teóricos por metro de coluna. Apesar dos valores poderem ser considerados satisfatórios, não se nota uma lógica nas variações dos valores do número de pratos entre os ensaios de E a H (Tabela 7). Também não se nota uma diferença considerável entre os valores

de resolução. Assim, essas duas respostas não foram satisfatórias para apontar uma condição ótima.

Tabela 7: Valores médios do tempo de retenção ( $t_R$ ) e número de pratos por metro (N/m).

Picos	Ensaio E		Ensaio F		Ensaio G		Ensaio H	
	$t_R$	N/m	$t_R$	N/m	$t_R$	N/m	$t_R$	N/m
1	2,7	2771	3,5	2770	2,1	1873	2,8	1925
2	6,6	5316	9,1	4903	5,5	3631	8,0	5965
3	10,0	6550	14,1	6942	8,5	3886	12,6	7312

Obs.:  $N/m = [5,54(t_R/W_{1/2})^2]/0,08$ , onde  $W_{1/2}$  é a largura do pico a meia altura.

Todos esses resultados mostram que foi possível separar os três esteroides em sua forma neutra e com um tempo de análise satisfatório. Alguns trabalhos utilizando HPLC, MECK, CEC ou CZE apresentam bons resultados na separação de alguns esteroides (BOCIAN *et al.*, 2012; BRITZ-MCKIBBIN *et al.*, 2003; FLOR *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010), mas utilizam processos trabalhosos de produção da FE com misturas de monômeros e funcionalização, sistemas mais complexos de eletrólitos, adição de surfactantes e elevado consumo de solventes. Ainda sim, tais trabalhos apresentam tempos de retenção semelhantes aos obtidos no presente estudo e a separação aqui ocorreu em um sistema relativamente simples. Além disso, a FEM à base do monômero MPTMS pode ser aplicada para analitos com características estruturais bastante diferentes, como os esteroides e os HPAs.

#### 4.1.2.3. Testes com amostra de gel transdérmico contendo esteroides

Gel transdérmico consiste em uma emulsão formada por uma fase hidrossolúvel que é o gel aquoso de polaxamer 407 e por uma fase lipossolúvel composta de uma solução de lecitina granulada e palmitato de isopropila. É um veículo de alta permeabilidade cutânea, com capacidade de carrear fármacos incorporados a ele. Foram realizados alguns testes em amostras de gel transdérmico manipulado contendo uma associação entre estriol e estradiol

para verificar o comportamento desse tipo de matriz frente às colunas monolíticas em análise por CEC.

Pelos resultados qualitativos obtidos com corridas eletrocromatográficas das amostras, é possível notar o potencial do uso da FEM na análise por CEC do estriol e do estradiol associados nesse tipo de matriz visto que os picos dos analitos não coeluem com nenhum constituinte da mesma, pois como se pode observar nos eletrocromatogramas da Figura 14A, não aparecem sinais em uma amostra contendo apenas os excipientes (é observado apenas um pico do sistema). Entretanto, a matriz pode ter influência no alargamento dos picos dos analitos quando estes estão presentes na formulação farmacêutica (Figura 14B). Apesar da progesterona não estar presente nessa formulação, é conveniente que se consiga a separação completa dos três esteroides em uma mistura, pois desta maneira o método poderá servir, por exemplo, para a identificação de contaminantes.

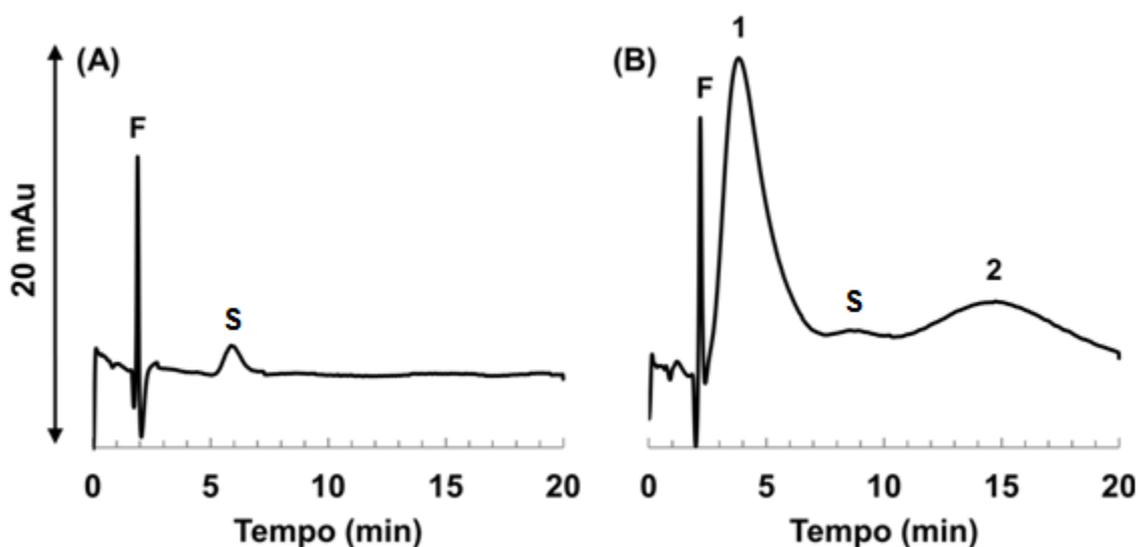


Figura 14: Eletrocromatogramas do (A) gel contendo apenas excipientes e do (B) gel contendo estriol e estradiol. Picos: F - fluxo; S - sistema; 1 - estriol; e 2 - estradiol. FM:  $\text{NH}_4\text{Ac}$   $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura:  $20^\circ\text{C}$ ; injeção: -25 mbar por 15 s; Detecção: 214 nm. Capilar TSU.

### 4.1.3. Correção da instabilidade e das interrupções da corrente elétrica

#### 4.1.3.1. Instabilidade devido à eletrólise

Foi observado durante as análises que havia um deslocamento dos picos para tempos de retenção menores ao longo de várias corridas e que esse deslocamento estava associado a uma redução da corrente. Inicialmente acreditou-se que esse fato devia-se a um problema de estabilidade da coluna monolítica e que um pré-condicionamento adequado deveria ser investigado. Entretanto, como se pode notar nos gráficos e eletrocromatogramas da Figura 15, não existe uma tendência de estabilização ao longo de quatorze corridas consecutivas.

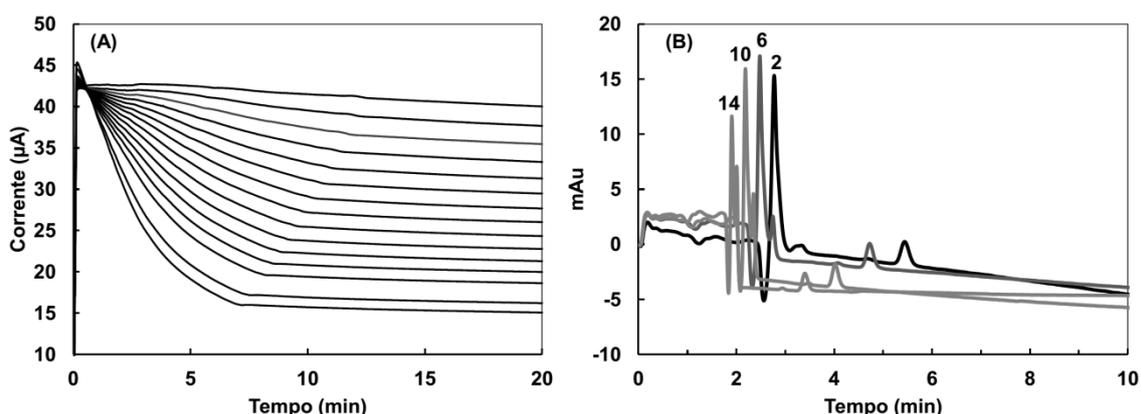


Figura 15: (A) Perfil da corrente durante 14 corridas eletrocromatográficas consecutivas. (B) Eletrocromatogramas de algumas corridas com injeção de tiouréia  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em metanol (números sobre os picos indicam a corrida). FM:  $\text{NH}_4\text{Ac } 16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  (60% v/v) e acetonitrila (40% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura:  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; injeção: -25 mbar por 5 s. Detecção: 214 nm. Capilar TSH.

Tem sido observado que em análises envolvendo CE a aplicação de voltagem provoca a eletrólise da solução eletrolítica, causando alterações de pH, redução da corrente elétrica e conseqüentemente variações na velocidade do FEO, levando a análises com variações grosseiras do tempo de retenção dos analitos (JESUS *et al.*, 2005; KELLY *et al.*, 1997; MACKA *et al.*, 1998). Em CEC esse problema é agravado, pois geralmente são empregados solventes

orgânicos que também sofrem eletrólise, como a acetonitrila (TEZUKA; IWASAKI, 2002). Uma solução para esse problema seria a renovação da FM entre cada corrida, ou pelo menos entre séries pequenas de corridas. Para tanto foi utilizado o sistema de *replenishment* do equipamento de CE, onde uma função na implementação do método pelo *software* permite a renovação da FM dos *vials* entre as corridas a partir de um reservatório. Esse processo foi feito para corridas consecutivas de uma mistura de padrões de esteroides intercaladas com corridas das amostras de gel transdérmico contendo esses esteroides, ou seja, foi possível fazer esse estudo em diferentes matrizes. A Figura 16 mostra o perfil da corrente elétrica com uso do sistema de *replenishment* do equipamento de CE, bem como os eletrocromatogramas das corridas envolvendo mistura de padrões dos esteroides. Observa-se que com a renovação da FM entre as corridas o perfil da corrente mantém-se visualmente constante, com uma pequena oscilação. Também é possível notar que não há deslocamentos consideráveis nos picos dos eletrocromatogramas.

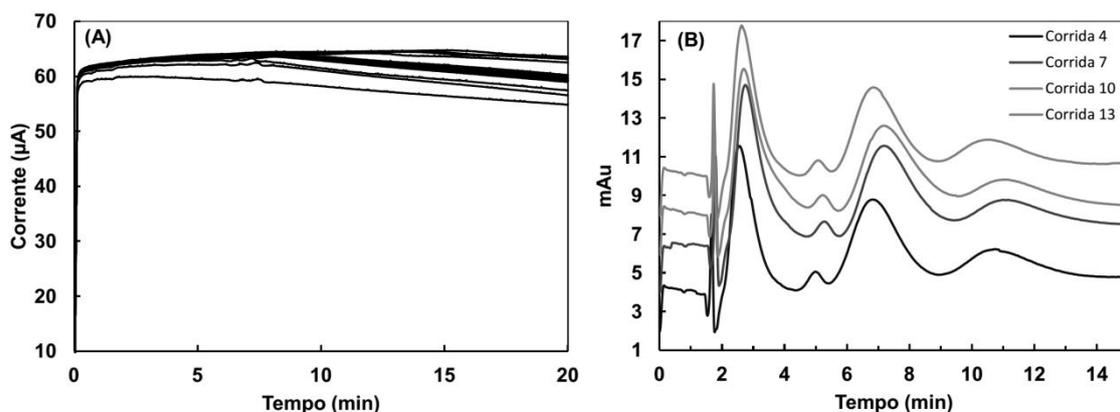


Figura 16: (A) Perfil da corrente ao longo de 14 corridas consecutivas que incluíram mistura de padrões e amostras. (B) Eletrocromatogramas de quatro corridas da mistura de padrões (estriol 4,03 mmol L<sup>-1</sup>, estradiol 4,33 mmol L<sup>-1</sup> e progesterona 5,07 mmol L<sup>-1</sup> em metanol). FM: NH<sub>4</sub>Ac 20,0 mmol L<sup>-1</sup> (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -25 kV; temperatura: 20°C; injeção: -25 mbar por 15 s; Detecção: 214 nm. Capilar: TSH.

Esses resultados ficam mais evidentes se analisarmos os desvios padrões relativos (DPR) dos valores de corrente elétrica das quatorze corridas consecutivas, com a renovação da FM e sem a renovação (Tabela 8). No primeiro caso, não existe variação significativa entre os DPR (5,30% - 5,89%). No segundo caso, a variação foi considerável (5,32% - 29,11%).

Tabela 8: Valores de desvio padrão relativo de quatorze corridas consecutivas.

Corrida	DPR (%)	
	Sem renovação	Com renovação
1	5,32	5,80
2	5,54	5,89
3	6,37	5,86
4	7,67	5,30
5	9,28	5,34
6	11,11	5,43
7	12,97	5,34
8	15,06	5,37
9	17,12	5,56
10	19,41	5,53
11	21,73	5,56
12	24,13	5,62
13	26,52	5,57
14	29,11	5,58

Cabe ressaltar que a coluna monolítica utilizada nessa etapa foi produzida em um capilar revestido com fluoropolímero da série TSH, diferente do utilizado no experimento do planejamento fatorial, que foi o revestido com fluoropolímero da série TSU. Apesar de ambas as colunas terem sido produzidas a partir da mesma solução fotopolimerizável, podem existir diferenças entre elas, da mesma forma como foi discutido anteriormente para o capilar revestido com poliacrilato, o que pode levar a variações nas colunas produzidas. Isso pode justificar a diferença no perfil dos picos da mistura de padrões com relação aos resultados do planejamento fatorial.

#### 4.1.3.2. Instabilidade e interrupções devido à formação de bolhas

Uma dificuldade encontrada nas análises eletrocromatográficas é a grande propensão à formação de bolhas na FM, principalmente devido à presença de solventes orgânicos, gerando instabilidade e interrupções da corrente e interferências no sinal dos analitos. Durante os experimentos foi constatada a necessidade de se utilizar pressurização simultânea de ambos os *vials* durante as corridas para suprimir a formação de bolhas. Essa pressurização permitiu obter correntes mais estáveis, como mostrado na Figura 17, indicando que a FM no interior do capilar se apresentou como um meio líquido com menos interrupções provocadas por bolhas, propiciando movimentação mais uniforme das cargas elétricas.

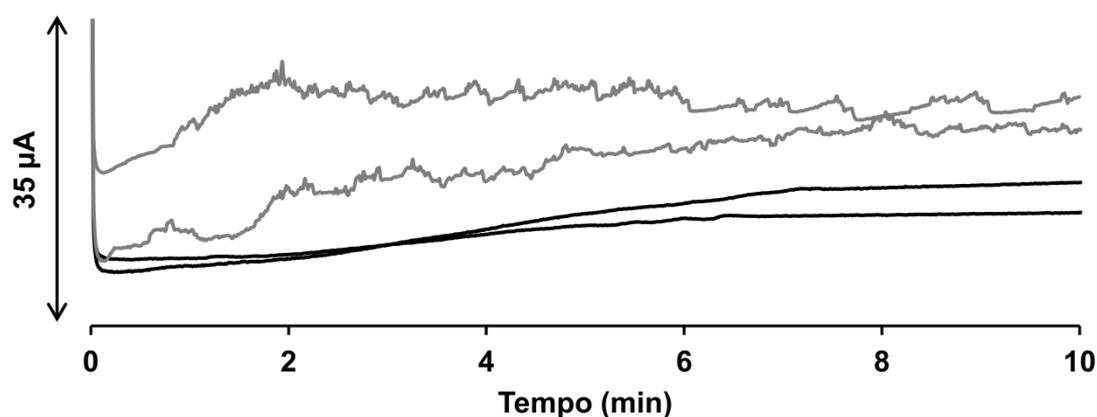


Figura 17: Perfil da corrente de duas corridas eletrocromatográficas com pressurização (linha preta) e duas sem pressurização (linha cinza). FM:  $\text{NH}_4\text{Ac}$   $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (70% v/v) e acetonitrila (30% v/v); voltagem: -20 kV; temperatura:  $20^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.4. Repetibilidade das corridas eletrocromatográficas

Após terem sido contornados os problemas citados anteriormente de instabilidade durante as corridas por CEC, duas colunas monolíticas em capilar TSU foram obtidas a partir de soluções fotopolimerizáveis preparadas de forma independente e foram utilizadas na separação de uma mistura de padrões dos

esteroides nas condições do ensaio G para verificar a repetibilidade no preparo da FEM. Foram avaliados os valores do tempo de retenção e o número de pratos teóricos referentes a cada pico (Tabela 9).

Tabela 9: Tempos de retenção e números de pratos a meia altura de duas colunas monolíticas preparadas de forma independente.

Picos	Coluna 1			Coluna 2		
	Tempo de retenção (min)					
	TC11	TC12	TC13	TC21	TC22	TC23
Fluxo	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4
Estriol	3,4	3,1	3,0	3,0	3,2	3,0
Estradiol	9,2	8,8	8,8	9,6	9,3	9,9
Progesterona	14,2	15,0	14,2	17,2	16,8	17,4
	Número de pratos					
	NC11	NC12	NC13	NC21	NC22	NC23
Fluxo	68041	72960	72171	44436	41003	47797
Estriol	1375	730	678	3059	2872	2632
Estradiol	3776	2481	2165	7441	7443	6347
Progesterona	2897	8116	3146	17307	17098	8684

Obs.: TC<sub>ij</sub>: tempo de retenção da coluna *i* na réplica *j*; NC<sub>ij</sub>: número de pratos da coluna *i* na réplica *j*.

Construindo um gráfico *Box-plot* (Figura 18) pelo *software SPSS (Release 8.0)*, podemos observar que a localização das caixas, os valores das medianas (linhas horizontais no interior das caixas) e a ausência de pontos discrepantes apontam para a similaridade entre os valores do tempo de retenção bem como do número de pratos tanto na comparação entre réplicas de uma mesma coluna quanto para a comparação entre réplicas de colunas diferentes. Além disso, o tamanho das caixas indica que as variabilidades também são semelhantes. Do ponto de vista qualitativo, esses resultados sinalizam repetibilidade entre as corridas eletrocromatográficas e também entre o preparo de duas colunas monolíticas independentes.

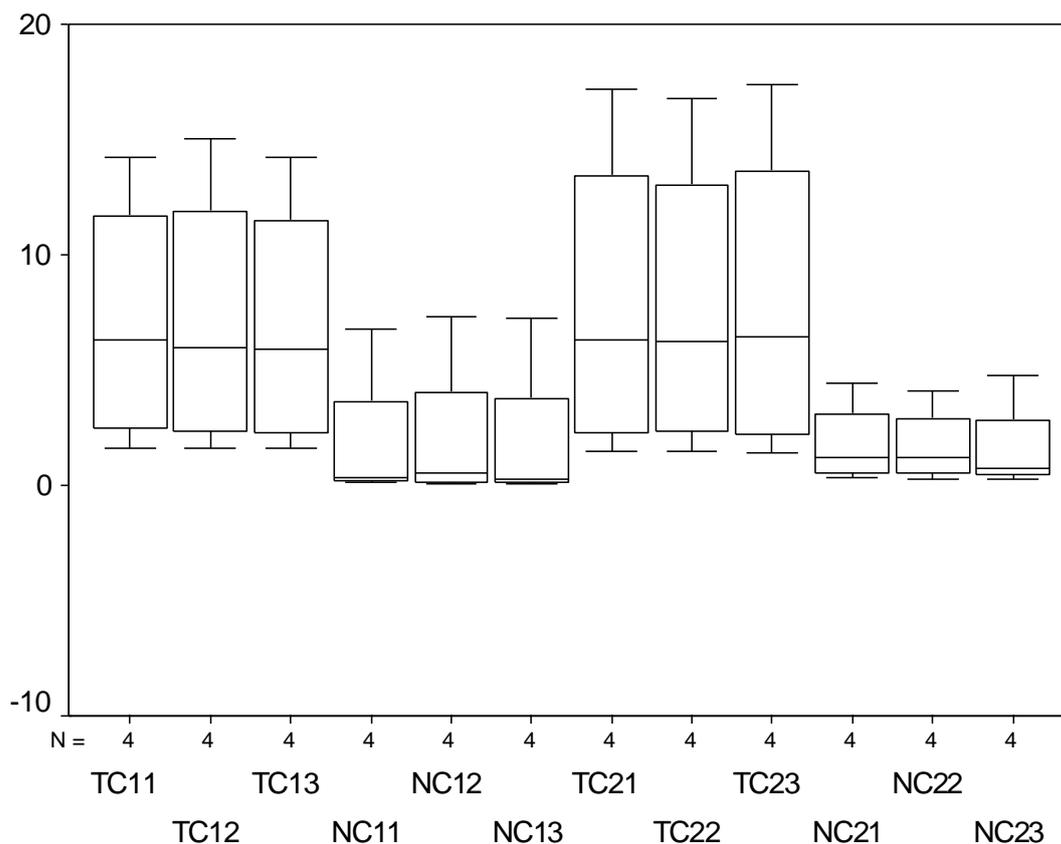


Figura 18: Gráfico *Box-plot* para as variáveis: tempo de retenção e número de pratos de duas colunas monolíticas preparadas de forma independente. O valor do número de pratos foi dividido por  $10^4$  para ficar dentro da escala. TCij: tempo de retenção da coluna  $i$  na réplica  $j$ ; NCij: número de pratos da coluna  $i$  na réplica  $j$ .

#### 4.2. COLUNA MONOLÍTICA EM CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

Foi realizada uma tentativa de utilização das colunas monolíticas em um sistema de LC envolvendo um equipamento RRLC. As colunas especificadas para esse equipamento possuem diâmetro interno da ordem de 1,0 a 4,6 mm e a vazão mínima do equipamento é de 0,05 mL/min. Pela Tabela 1 podemos dizer que o equipamento RRLC funciona como um sistema de HPLC *microbore*. Os testes mostraram que as dimensões das colunas testadas (100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) não são adequadas para esse tipo de equipamento, devido ao fluxo mínimo do sistema ainda ser elevado, gerando

pressões acima de 500 bar, desestabilizando o sistema e danificando a FEM. Devido a esse fato, os testes ficaram comprometidos e não foi possível otimizar as condições de análise. Entretanto, em alguns casos foi possível obter cromatogramas que sugerem que as colunas podem ser capazes de separar os analitos estudados através da LC, como o exemplo da Figura 19 em que se observam três picos em um cromatograma de uma mistura de fenantreno, criseno e benzo[a]pireno. Dessa forma, acredita-se que com as dimensões apropriadas, ou seja, em capilares com dimensões maiores talvez se consiga utilizar as colunas monolíticas nesse tipo de sistema cromatográfico RRLC. Outra perspectiva é a de se utilizar as colunas monolíticas de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno em outros tipos de equipamentos que permitam fluxos menores coerentes com o tamanho das colunas capilares.

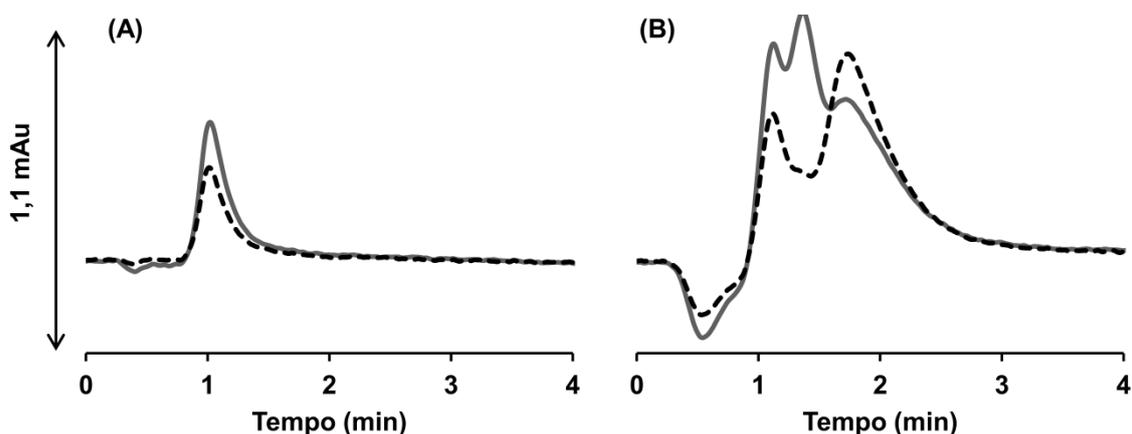


Figura 19: Cromatogramas obtidos em uma coluna monolítica produzida em capilar revestido com poliacrilato: (A) acetonitrila (branco); (B) mistura de fenantreno, criseno e benzo[a]pireno  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  diluídos em acetonitrila. FM: acetonitrila (30% v/v) e água (70% v/v). Vazão: 0,15 mL/min. Injeção: 0,1  $\mu\text{L}$ . Tamanho da coluna: 20,0 cm. Detecção: 250 nm (linha cheia) e 270 nm (linha tracejada).

#### 4.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CAPILAR REVESTIDO COM FLUOROPOLÍMERO

Um avanço que se acredita ter alcançado com esse trabalho foi mostrar a possibilidade de se utilizar diferentes tipos de capilares no preparo das

colunas. Devido à presença de uma etapa de fotopolimerização *in situ*, é necessário que os capilares sejam transparentes à radiação utilizada. A absorção máxima do fotoiniciador FMBF ocorre a 375 nm e é importante que haja boa transmitância do revestimento nessa região (VAZ *et al.*, 2008a). Além do mais, a transparência do capilar facilita o processo de preenchimento com controle visual. Os três capilares utilizados nesse trabalho se mostraram apropriados para a etapa de preenchimento e fotopolimerização. Todavia, até o presente trabalho, não havia sido testada a produção das colunas monolíticas sob as condições descritas aqui em capilares revestidos com fluoropolímeros (séries TSH e TSU).

A transparência dessas duas séries de capilar permite também o controle visual do preenchimento com a solução fotopolimerizável até a seção do capilar desejada. Todavia, o capilar TSU apresenta uma vantagem que é a não necessidade de remoção do revestimento para obtenção da janela de detecção, visto que sua transmitância é maior do que 90% a 214 nm segundo o catálogo do fabricante, ou seja, possui baixa absorbância da radiação UV em comparação com outros tipos de capilares. Cabe lembrar que a remoção do revestimento para a janela de detecção reduz drasticamente a resistência do capilar nessa região e perda de capilares por quebra na janela são frequentes.

Os capilares da série TSU e TSH têm se mostrado mais resistentes como um todo, ou seja, não quebram e nem perdem o revestimento facilmente, o que é uma vantagem em relação ao capilar de poliacrilato. Entretanto, esse pode ser obtido sem a necessidade de importação já que é produzido por um grupo de pesquisa da UNESP. Dessa forma, a utilização desses tipos de capilar de sílica fundida é uma boa alternativa para a produção de colunas monolíticas fotopolimerizáveis.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de FEM tem ganhado grande atenção mundialmente, principalmente pelo fato de sua fácil e versátil aplicação em técnicas cromatográficas de dimensões capilares. O domínio de conhecimento na produção de uma coluna cromatográfica cria a liberdade para que se possa inovar e evitar as limitações das colunas comerciais. Além do mais, a produção de colunas monolíticas em capilares de sílica fundida permite o aproveitamento de um único equipamento para duas técnicas: CE e CEC. Um equipamento de CE é de modo geral bastante compacto e o consumo de solventes é bastante reduzido, o que seria uma vantagem tanto do ponto de vista ambiental quanto do financeiro, quando se avalia o consumo e descarte de produtos químicos.

Neste trabalho foi possível reproduzir o processo de produção de colunas monolíticas baseadas no monômero MPTMS conforme desenvolvido pelo GQAQ, implementando o uso de capilares de sílica fundida revestidos com fluoropolímero como suporte para a FEM. A adoção de capilares de sílica fundida revestidos externamente por fluoropolímero se mostrou adequada à utilização da fotopolimerização no preparo da FEM, pois esse revestimento é transparente à radiação UV utilizada tanto na fotopolimerização quanto na detecção dos analitos propostos para análise por CEC. Dessa forma, o preparo da FEM se mostrou prático e rápido, mantendo a flexibilidade e resistência mecânica do capilar, favorecendo o seu manuseio.

Diversos detalhes operacionais no preparo e uso das FEM se revelam a todo o momento. Antes do estudo envolvendo as condições de pressurização e renovação da fase móvel, muito tempo foi gasto com colunas danificadas e quedas de correntes durante as análises, problemas que foram solucionados nesse trabalho. Além disso, notou-se que soluções fotopolimerizáveis armazenadas por certo período de tempo geravam colunas com baixa porosidade e que esse também era um fator responsável pela formação de bolhas durante as análises. Como foi mencionado no texto introdutório, o polímero pode sofrer intumescimento e encolhimento que levam à sua deterioração e foi observada a necessidade de manter o interior do capilar com algum solvente quando a coluna não estiver em uso para prolongar sua vida

útil. Em relação a isso, ainda é preciso realizar estudos sobre a durabilidade das colunas.

Com o planejamento fatorial foi possível encontrar uma condição de análise que permitiu a separação satisfatória por CEC da mistura padrão de estriol, estradiol e progesterona como espécies não carregadas em um tempo relativamente pequeno e com boa resolução entre os picos. Tendo em vista o potencial da FEM baseada no monômero MPTMS para análise de hormônios esteroides por CEC, pretende-se futuramente utilizar essa FEM para quantificar esses hormônios em amostras de gel transdérmico e comparar os resultados com outras técnicas, como HPLC.

A utilização da FEM na separação eletrocromatográfica tanto de HPAs quanto de hormônios esteroides é um resultado importante, pois mostra que uma mesma coluna produzida de forma simples pode ser usada para analitos com características estruturais bastante distintas sem a necessidade de se otimizar todo o processo de produção da FEM, bastando adaptar alguns fatores do sistema de corrida, como composição da FM e voltagem.

Pretende-se dar continuidade ao desenvolvimento das FEM com a tentativa de aplicá-la também em técnicas de LC. Uma alternativa seria a construção de um sistema cromatográfico *labmade* envolvendo bombas com dispensa de nanovolumes que podem ser encontradas comercialmente. Outra opção seria a utilização do próprio equipamento de CE que é capaz de bombear a FM por aplicação de pressão e permite injeção de volumes de amostra apropriados para sistemas capilares.

## 6. REFERÊNCIAS

BERNABÉ-ZAFÓN, V.; BENEITO-CAMBRA, M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3231-3237, 2010.

BOCIAN, S.; SOUKUP, J.; MATYSKA, M. influence of the organic modifier in hydro-organic mobile phase on separation selectivity of steroid hormones separation using cholesterol-bonded stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 90-97, 2012.

BRITZ-MCKIBBIN, P.; ICHIHASHI, T.; TSUBOTA, K.; CHEN, D. D. Y.; TERABE, S. Complementary on-line preconcentration strategies for steroids by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1013, n. 1-2, p. 65-76, 2003.

CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1507-12, 1996.

DABEK-• ZLOTORZYNSKA, E.; CELO, V.; YASSINE, M. M. Recent advances in CE and CEC of pollutants. **Electrophoresis**, p. 310-323, 2008.

DING, J.; SZELIGA, J.; DIPPLE, A.; VOUIROS, P. Application of mixed mobile phases and a step gradient method in capillary electrochromatography for the separation of isomeric polycyclic aromatic hydrocarbon-deoxyribonucleoside adduct mixtures prepared in vitro. **Journal of Chromatography A**, v. 781, p. 327-334, 1997.

EUERBY, M. R.; JOHNSON, C. M.; CIKALO, M.; BARTLE, K. D. "Short-end injection" rapid analysis capillary electrochromatography. **Chromatographia**, v. 47, n. 3-4, p. 135-140, 1998.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I C S F. Fases estacionarias monoliticas para separacoes cromatograficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.

FLOR, S.; LUCANGIOLI, S.; CONTIN, M.; TRIPODI, V. Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 19, p. 3305-3013, 2010.

GARGUILO, M.; THOMAS, D.; ANEX, D.; RAKESTRAW, D. Laser-induced dispersed fluorescence detection of polycyclic aromatic compounds in soil extracts separated by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 883, p. 231-248, 2000.

GIACOMINI, D. R.; APARECIDA, E.; MELLA, C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens Hormonal Replacement: advantages and disadvantages. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v. 27, p. 71-92, 2006.

GUSEV, I.; HUANG, XIAN; HORVATH, C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 273-290, 1999.

HILDER, E.; SVEC, FRANTISEK; FRÉCHET, J. Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 3-22, 2004.

HUWITZ, A.; LIU, S. Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens. **Journal of Pharmaceutical Science**, p. 624-627, 1977.

JESUS, D. P. DE; BRITO-NETO, J. G. A.; RICHTER, E. M. *et al.* Extending the lifetime of the running electrolyte in capillary electrophoresis by using additional compartments for external electrolysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 3219-3226, 2005.

JI, A J.; NUNEZ, M. F.; MACHACEK, D. *et al.* Separation of urinary estrogens by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 690, p. 149-154, 1995.

JIN, W.; FU, H.; HUANG, XIADONG; XIAO, H.; ZOU, H. Optimized preparation of poly(styrene-co- divinylbenzene-co-methacrylic acid) monolithic capillary column for capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 24, n. 18, p. 3172-80, 2003.

KELLY, M. A.; ALTRIA, K. D.; CLARK, B. J. Approaches used in the reduction of the buffer electrolysis effects for routine capillary electrophoresis procedures in pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 73-80, 1997.

LI, W.; FRIES, D.; MALIK, A. Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 23-52, 2004.

MACKA, M.; ANDERSSON, P.; HADDAD, P. R. Changes in electrolyte pH due to electrolysis during capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 743-749, 1998.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M. *et al.* Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol-Total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7957-61, 2009.

MUHLEN, C. VON; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

OU, J.; GIBSON, G. T. .; OLESCHUCK, R. D. Fast preparation of photopolymerized poly (benzyl methacrylate- co-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 22, p. 3628-3634, 2010.

PATERSON, C. J.; BOUGHTFLOWER, R. J. Capillary electrochromatography (CEC). **Handbook of Analytical Separations**. [S.l.]: Elsevier Science B. V., 2000. v. Ip. 107-125.

POSTHUMUS, W.; MAGUSIN, P. Surface modification of oxidic nanoparticles using 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 109-116, 2004.

PURSCH, M.; SANDER, L. C. Stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 313-326, 2000.

SATINDER, A.; MOHAMEDILIAS, J. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. 1. ed. [S.l.]: Academic Press, 2008. p. 490

SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I.C.S.F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 431–440, 2009.

SILVA, C. A; PEREIRA, E. A; MICKE, G. A; FARAH, J. P. S.; TAVARES, MARINA F M. Mixture-designed electrolytes for the MEKC separation of natural and synthetic steroids. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3722-30, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. [S.l.]: Thomson, 1997. v. 2

SVEC, F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 902-924, 2010.

SVEC, F.; TENNIKOVA, T. B.; DEYL, Z. Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications. **Journal of Chromatography Library**, v. 67, p. 800, 2003.

TAVARES, M F M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 97, n. 1, p. 493-511, 1997.

TEZUKA, M.; IWASAKI, M. Aromatic cyanation in contact glow discharge electrolysis of acetonitrile. **Thin Solid Films**, v. 407, n. 1-2, p. 169-173, 2002.

TOMŠÍKOVÁ, H.; AUFARTOVÁ, J.; SOLICH, P. *et al.* High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35-58, 2012.

VAZ, F. A.; CASTRO, P.; MOLINA, C. External polyacrylate-coating as alternative material for preparation of photopolymerized sol-gel monolithic column. **Talanta**, v. 76, p. 226-229, 2008.

VAZ, F.; MOUTINHO, A.; MENDONÇA, J. *et al.* Optimization of photopolymerized sol-gel monolithic stationary phases prepared in polyacrylate-coated fused-silica capillaries for capillary electrochromatography. **Microchemical Journal**, v. 100, p. 21-26, 2012.

VAZ, F.; QUEIROZ, M.; RIBEIRO, S. Construção de Câmara de Luz Ultravioleta para Fotopolimerização de Fases Estacionárias Monolíticas. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2156-2158, 2008.

WANG, X.; DING, K.; YANG, C. *et al.* Sulfoalkylbetaine-based monolithic column with mixed-mode of hydrophilic interaction and strong anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 31, n. 17, p. 2997-3005, 2010.

WU, M.; WU, R.; ZHANG, Z.; ZOU, H. Preparation and application of organic-silica hybrid monolithic capillary columns. **Electrophoresis**, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2011.

YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, p. 545-551, 2002.

ZHENG, J.; RIZVI, S. A. A.; SHAMSI, S. A.; HOU, J.; DESIGN, D. Coupled to Atmospheric Pressure Photoionization Mass Photopolymerized Sol-Gel Monolithic Coupled to Atmospheric Pressure. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, p. 43-57, 2007.

ZOU, H.; HUANG, XIAODONG; YE, M.; LUO, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 5-32, 2002.