

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



Preparação de Fases Estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, Imobilizadas por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Marcos André Kapor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim



UNICAMP

Instituto de Química

Campinas

Novembro 2001

*Dedico esta Tese aos meus pais Marcos e Maria e
a minha namorada Thaís.*

Obrigado pela ajuda, carinho, amor e dedicação!

ÍNDICE GERAL

Curriculum Vitae	VII
Agradecimentos	IX
Resumo	X
Abstract	XII
Índice de figuras	XIV
Índice de tabelas	XVI
1. Introdução	1
1.1 Fases estacionárias reversas	2
1.1.1 Fases estacionárias líquidas	3
1.1.2 Suportes cromatográficos	4
1.2 Fases quimicamente ligadas	5
1.3 Imobilização por microondas de fases estacionárias sorvidas	6
1.4 Avaliação de colunas cromatográficas	11
1.5 Emprego da quimiometria na otimização de condições experimentais	16
2. Objetivos	19
3. Parte Experimental	21
3.1 Materiais	22
3.1.1 Reagentes e solventes	22
3.1.2 Gases empregados	22
3.1.3 Fase estacionária líquida	22
3.1.4 Suporte cromatográfico	23
3.1.5 Pesticidas utilizados	23
3.2 Equipamentos	24
3.2.1 Calibração do forno de microondas	25
3.3 Confeccção e polimento das colunas cromatográficas	26
3.4 Preparação da fase móvel	27

3.5	Preparação do material de recheio	27
3.5.1	Quantidade de fase estacionária líquida sobre o suporte	27
3.5.2	Solvente de preparação da fase estacionária	28
3.5.3	Procedimento de preparação da fase estacionária	28
3.6	Irradiação das fases estacionárias por microondas	29
3.7	Estudo da influência da ativação do suporte cromatográfico, tempo de irradiação e presença de solvente orgânico na preparação de fases baseadas em sílica Davisil, 10 μm , e PMOS	30
3.8	Estudo da presença de quantidades adicionais de água no suporte cromatográfico	31
3.9	Preparo da suspensão	31
3.10	Procedimento de enchimento e condicionamento de colunas cromatográficas	32
3.11	Preparo de fases estacionárias baseadas em sílica Spherisorb, 5 μm , e PMOS	34
3.11.1	Estudo da extração da FE imobilizada	34
3.11.2	Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}	35
3.12	Caracterização das fases estacionárias	36
3.12.1	Análise Elementar de Carbono	36
3.12.2	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	36
3.12.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	37
3.12.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
3.13	Avaliação das colunas	37
3.14	Estabilidade química das FE	38
3.15	Aplicação em análise de pesticidas das colunas recheadas com fases estacionárias imobilizadas por microondas	39
4.	Resultados e Discussão	40
4.1	Estudo da influência da ativação do suporte cromatográfico, tempo de irradiação e presença de solvente orgânico na preparação de fases baseadas em sílica Davisil, 10 μm , e PMOS	41

4.2 Estudo da presença de quantidades adicionais de água no suporte cromatográfico	43
4.3 Otimização dos Parâmetros envolvidos no preparo das fases imobilizadas por microondas	44
4.4 Preparo de FE baseadas em sílica Spherisorb 5 μm e PMOS	46
4.4.1 Estudo da Extração da FE imobilizada	46
4.4.2 Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4+1}	47
4.5 Caracterização das fases estacionárias	51
4.5.1 Análise Elementar de Carbono	51
4.5.2 Espectroscopia no Infravermelho	52
4.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^{29}Si)	54
4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	57
4.6 Teste de estabilidade química das FE	58
4.7 Aplicação das colunas recheadas com fases estacionárias imobilizadas por microondas em análises de pesticidas	60
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas	68

Curriculum Vitae

FORMAÇÃO

* Bacharelado em Química concluído em 1998

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

* Mestrado

Preparação de Fases Estacionárias SiO₂(PMOS) Imobilizadas Por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

UNICAMP – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ATIVIDADES

- Apresentação do trabalho "Preparação de fases estacionárias (FE), C-8 sorvidas e imobilizadas por microondas para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)" na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química realizado no período de 28 a 31 de Maio de 2001 em Poços de Caldas- MG.
- Apresentação do trabalho "Comportamento de fases estacionárias (FE) C-8 imobilizadas por microondas frente a diferentes condições de extração" na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química realizado no período de 28 a 31 de Maio de 2001 em Poços de Caldas- MG.
- Apresentação do trabalho "Preparation of Stationary Phases, C-8 sorbed and immobilized by microwaves for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)" no 25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, de 17 a 22 de Junho de 2001, MECC Maastricht, Holanda.
- Apresentação do trabalho "Planejamento fatorial aplicado no preparo de fases estacionárias imobilizadas por microondas" que será apresentado no 11º Encontro Nacional de Química Analítica de 18 a 21 de Setembro de 2001 na Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP.

- Apresentação do trabalho "Voltametria de Redissolução Adsorptiva do corante ácido Índigo Carmin na presença e ausência de cobre (II)" na 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizada no período de 24 a 27 de Maio de 1997 em Poços de Caldas- MG.
- Apresentação do trabalho "Eletroanálise de corante alimentício" no IX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado no período de 24 a 25 de Outubro de 1997 em Ilha Solteira- SP.
- Apresentação do trabalho "Determinação do corante Tartrazina em amostras de sucos e balas artificiais através de Voltametria de redissolução catódica" no X Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado no período de 08 a 09 de Outubro de 1998 em Rio Claro- SP.
- Apresentação do trabalho "Adsorptive Stripping Voltammetric determination of Indigotine and Tartrazine in artificially coloured foodstuffs" no I Brazilian Meeting on the Chemistry of Food and Beverages, realizado na Universidade de São Paulo Câmpus de São Carlos no período de 01 a 03 de Dezembro de 1998 em São Carlos –SP, Brasil.
- Monografia: "Determinação dos corantes Índigo Carmin e Tartrazina em amostras de sucos e balas artificiais através de voltametria de redissolução adsorptiva".
- Iniciação à Pesquisa Científica realizada na UNESP com o trabalho: "Determinação dos corantes Índigo Carmin e Tartrazina em amostras de sucos e balas artificiais através de voltametria de redissolução adsorptiva".
- Artigo "Eletroanálise de Corantes alimentícios: Determinação de Indigo carmin e Tartrazina" submetido a revista Eclética Química.

Agradecimentos

- À Prof^a Dr^a Isabel Jardim, pela ajuda na formação científica de seus alunos, pela amizade, pela orientação segura e amiga, pela compreensão e pela oportunidade concedida para fazer parte desse grupo de pesquisas.
- Aos Prof^o Dr^o Kenneth Collins e Prof^a Prof^a Dr^a Carol Collins, pelo auxílio no desenvolvimento de inúmeros projetos e pela lição de vida demonstrada em prol da ciência.
- Ao Prof^o Dr^o Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela ajuda e orientação na utilização dos fornos de microondas.
- Aos meus irmãos Humberto e Rosângela. Agradeço pela ajuda, carinho, preocupação e amor demonstrados durante todos os dias de minha vida.
- Aos meus avós Francisco, Isabel, Zeferino e Carmem. Obrigado pela luz e orientação.
- Aos integrantes do clube dos 4: Edivan, Lúcio e Waltinho, pela grande amizade, compreensão, companheirismo, paciência.
- Aos colegas de laboratório: Carla, Camila, Lúcia, Sônia, Jose, Zahra, Gláucia, Dania, Nilva, Ricardo, César e Roberto pela amizade, companheirismo e paciência.
- A Priscila pela amizade e apoio no laboratório.
- Aos meus padrinhos Antonio e Márcia, pelo carinho e ajuda.
- A todos familiares.
- Ao Dr. Elias Jorge.
- Aos colegas do grupo GEPAM: Clésia, Edenir, Luciana e Madson
- A todos aqueles que contribuíram com a realização desse trabalho.
- A Deus, pela vida.

RESUMO

Título: Preparação de fases estacionárias, SiO₂(PMOS), imobilizadas por microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Autor: Marcos André Kapor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Palavras chaves: *fases estacionárias, imobilização por microondas, CLAE*

Na preparação de fases estacionárias (FE), uma alternativa para minimizar os efeitos indesejáveis dos grupos silanol consiste em promover um recobrimento mais efetivo da superfície da sílica pela sorção de um polímero sobre o suporte cromatográfico, obtendo-se a fase sorvida. A estabilidade destas FE é aumentada pelo processo de imobilização como, por exemplo, radiação microondas. A principal consequência dos fenômenos de migração iônica e rotação dipolar, causados pela radiação microondas, é um super aquecimento das amostras compostas por íons ou moléculas polares. Sendo assim, o principal objetivo desse trabalho foi o de utilizar a radiação microondas como método alternativo de imobilização, visando obterem FE imobilizadas com alta eficiência e estabilidade. As FE foram preparadas por evaporação, a temperatura ambiente, de uma mistura de poli(metilooctil-siloxano) (PMOS), sílica Davisil 10 μm e diclorometano, e imobilizadas, posteriormente, em forno de microondas. Valores de eficiência 22.300 pratos m^{-1} foram obtidos, com um fator de assimetria de 1,5, para as fases sorvidas, enquanto que para as fases imobilizadas por microondas à 495 watts, por 900 segundos, foram obtidas colunas com 44.700 pratos m^{-1} e fator de assimetria de 1,1. O mesmo procedimento de preparação foi empregado para sílica Spherisorb 5 μm , obtendo-se eficiência de 89.400 pratos m^{-1} e fator de assimetria de 1,5 para as fases imobilizadas por microondas, na mesmas condições citadas acima. Adicionalmente, os resultados de análise elementar de carbono e espectroscopia no infravermelho comprovaram o efeito positivo do uso da radiação microondas na

imobilização das FE. A FE foi aplicada na separação de multirresíduos de pesticidas e na análise de urina fortificada com diuron e linuron obtendo-se separações satisfatórias, comprovando assim a potencialidade das FE preparadas.

ABSTRACT

Title: Preparation of stationary phases, SiO₂(PMOS), immobilized by microwaves for High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Author: Marcos André Kapor

Supervisor: Prof. Dr. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Key words: stationary phases, immobilization by microwaves, HPLC

In the preparation of stationary phases (SP), an alternative to minimize the undesirable effects of the silanol groups consists of promoting a better covering of the surface of the silica by the sorption of a polymer onto the support, a sorbed phase being obtained. The stability of these SP is increased by the immobilization process using, as an example, microwave radiation. The main consequence of the phenomena of ionic migration and dipolar rotation, caused by the microwave radiation, is a fast heating of samples composed of ions or polar molecules. The main objective of this work is to use microwave radiation as an alternative method of immobilization, seeking to obtain SP immobilized with high efficiency and stability. Thus SP was prepared by evaporation at room temperature of a mixture of poly(methyloctylsiloxane) (PMOS), 10 μm Davisil silica and dichloromethane, and later immobilized in a microwave oven. Values of 22300 plates m^{-1} were obtained, with an asymmetry factor of 1.5, for sorbed phases, while, for phases immobilized by microwaves at 495 watts for 900 seconds, columns were obtained with 44700 plates m^{-1} and an asymmetry factor of 1.1. The same preparation procedure was used for PMOS with 5 μm Spherisorb silica, with an efficiency of 89400 plates m^{-1} and an asymmetry factor of 1.5 being obtained for a phase immobilized by microwaves. The results of elemental analysis for carbon and IR spectroscopy proved the positive effect of the use of microwave radiation for the immobilization of the SP. The SP was applied in the separation of pesticides and in

the analysis of diuron and linuron in urine with good separations being obtained, showing the potential of the SP prepared.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da sílica-gel	4
Figura 2- Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica	5
Figura 3- Diagrama simplificado de um forno de microondas e seus principais componentes	8
Figura 4- Mecanismo de condução iônica	9
Figura 5- Mecanismo de rotação dipolar	10
Figura 6- Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos	11
Figura 7- Medida e cálculo do fator de assimetria do pico	14
Figura 8- Curva da equação de van Deemter	15
Figura 9- Cromatógrafo à líquido e sistema de aquisição de dados utilizado no trabalho	25
Figura 10- Interação da radiação microondas com os materiais	29
Figura 11- Esquema geral do sistema de enchimento utilizado	33
Figura 12- Sistema de enchimento de colunas utilizado no LABCROM	33
Figura 13- Cromatogramas sobre a influência da ativação do suporte, Presença de solvente orgânico na irradiação e tempo de irradiação	42
Figura 14- Cromatograma obtido com a FE SiO ₂ (PMOS), 10 μm, (Si tratada com H ₂ O) e imobilizada em P= 338 W e t _i = 360s	43
Figura 15- Cromatogramas de fases estacionárias baseadas em sílica 10 μm e PMOS	45
Figura 16- Curva de van Deemter para coluna recheada com FE SiO ₂ (PMOS) imobilizada por microondas utilizando t _i = 900 s, P= 495 W	46
Figura 17- Cromatogramas de fases estacionárias SiO ₂ (PMOS), 5μm, Irradiadas por microondas à potência de 495 W, por 900 s e expostas a três condições de extração	48
Figura 18- Cromatogramas de fases estacionárias SiO ₂ (PMOS), 5μm, Irradiadas por microondas à potência de 495 W, por 900 s obtidos através	

do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	50
Figura 19- Espectros no Infravermelho de FE SiO ₂ (PMOS), 10 μm	53
Figura 20- Espectros no Infravermelho de FE SiO ₂ (PMOS), 5 μm	55
Figura 21- Espectros de RMN ²⁹ Si das FE sorvidas e imobilizadas por microondas	56
Figura 22- Microscopias eletrônicas de varredura	57
Figura 23- Comparação de estabilidade química das FE Rainin C-8 e imobilizadas por microondas	59
Figura 24- Cromatogramas obtidos na análise de multirresíduo de pesticidas utilizando dois diferentes tipos de FE	61
Figura 25- Curva analítica para o herbicida diuron obtida com a coluna recheada com FE imobilizada por microondas	63
Figura 26- Curva analítica para o herbicida linuron obtido com coluna recheada com FE imobilizada por microondas	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Matriz de planejamento contendo o ensaio experimental, os fatores controlados (F_1 e F_2) em dois níveis (+ e -), a resposta média (R) obtida e o efeito de interação entre os fatores (F_1F_2)	18
Tabela 2. Condições empregadas no preparo das fases estacionárias SiO_2 (PMOS), 10 μm , imobilizadas por microondas	30
Tabela 3. Efeitos, fatores e níveis selecionados na aplicação do planejamento fatorial 2^{4-1}	35
Tabela 4. Influência da ativação do suporte, presença de solvente orgânico e tempo de irradiação nos parâmetros cromatográficos obtidos para as FE SiO_2 (PMOS) sobre sílica de 10 μm	41
Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos para a FE SiO_2 (PMOS), 10 μm , (Si tratada com H_2O) e irradiada por um tempo de 360 s e potência de 338 W	43
Tabela 6. Influência da potência e tempo de irradiação nos parâmetros cromatográficos de FE SiO_2 (PMOS) sobre sílica de 10 μm	44
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos das fases estacionárias SiO_2 (PMOS), 5 μm , imobilizadas por microondas e submetidas à três condições de extração	46
Tabela 8. Resultados de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado a fases estacionárias SiO_2 (PMOS), 5 μm , imobilizadas por microondas à potência de 495 W, por 900 s	49
Tabela 9. Efeitos dos fatores estudados para um fatorial completo 2^4	49
Tabela 10. Parâmetros cromatográficos e % de carbono das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas, preparadas a partir de sílica Davisil 10 μm e PMOS	51
Tabela 11. Parâmetros cromatográficos e % de carbono das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas, preparadas	

a partir de sílica Spherisorb 5 μm e PMOS	52
Tabela 12. Recuperações do diuron após extração e análise em coluna recheada com FE SiO_2 (PMOS), 5 μm , irradiada por microondas	62
Tabela 13. Recuperações do herbicida linuron após extração e análise em coluna recheada FE imobilizada por microondas	62
Tabela 14. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de herbicidas em urina	62

1.Introdução

Nos últimos 30 anos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem-se tornado um dos métodos de instrumentação analítica mais eminente. As principais razões para o rápido desenvolvimento desta técnica são a capacidade de analisar compostos orgânicos e inorgânicos, além de substâncias de alta massa molar ou substâncias ionizáveis. Além disso, com a CLAE é possível alta resolução na análise de misturas complexas, boa detectabilidade e possibilidade de automatização.

A forma mais tradicional de CLAE consiste em um material poroso polar, como sílica ou alumina, e uma fase móvel apolar baseada em hidrocarbonetos como éter de petróleo ou hidrocarbonetos clorados como clorofórmio. Esta forma de CLAE é chamada de fase normal, onde o mecanismo de separação é o de sorção-dessorção. A separação se dá de acordo com interações entre os grupos funcionais dos analitos com os sítios polares da superfície do material de recheio. Entretanto as separações realizadas no modo fase normal têm perdido importância nos últimos anos para aquelas realizadas no modo fase reversa.

A CLAE com fase reversa é um dos métodos analíticos de separação mais populares. Aproximadamente 90% de todas as separações na CLAE são realizadas com recheios de fase estacionária reversa. Sistemas de fase reversa consistem de uma fase estacionária de menor polaridade, predominante lipofílica, e uma fase móvel de maior polaridade, principalmente hidrofílica.¹

1.1 Fases estacionárias reversas

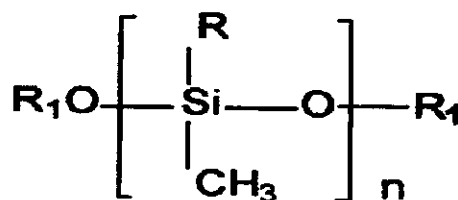
A CLAE realizada no modo fase reversa (CLAE-FR) é uma das técnicas mais utilizadas atualmente devido ao seu amplo campo de aplicação, como estudos farmacológicos, controle de qualidade de alimentos e análise de pesticidas e contaminantes em solos e água. Além disso a CLAE-FR possui alta estabilidade frente a diferentes solventes orgânicos, alta reprodutibilidade dos fatores de

retenção obtidos em suas análises e pode ser operada utilizando eluição por gradiente. Porém apresenta como principais desvantagens, uma baixa estabilidade na faixa de $\text{pH} < 2$ e $\text{pH} > 8$ e a presença de grupos silanóis residuais, presentes na superfície da sílica, que podem contribuir para adsorção irreversível de analitos básicos durante as análises cromatográficas.

1.1.1- Fases estacionárias líquidas

A classe mais comum de fases estacionárias líquidas para cromatografia líquida é constituída de polímeros de silicone ou polissiloxanos. Eles são encontrados em uma faixa extensa de seletividade, de acordo com os grupos substituintes existentes nas diversas estruturas, como por exemplo: poli(metilsiloxano), poli(metilfenilsiloxano), poli(metiloctilsiloxano), poli(metiloctadecilsiloxano) entre outros ².

Os poli(metilalquilsiloxanos) apresentam fórmula geral:³



onde: R= octil, dodecil, hexadecil, octadecil

R₁ = trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

1.1.2- Suportes cromatográficos

A função do suporte cromatográfico na preparação de materiais de recheio é reter a fase estacionária líquida sob a forma de um filme líquido com a menor espessura possível. Como suporte pode-se utilizar a sílica⁴, a alumina⁵, o carbono⁶ e outros materiais. A sílica gel é o suporte mais usado para fase reversa em CLAE⁷ por ser um sólido rígido, de área superficial grande, mecanicamente estável quando submetido a altas pressões utilizadas no enchimento das colunas e nas separações cromatográficas.

A superfície da sílica apresenta três tipos de grupos silanóis: vicinais (dois grupos hidroxila sobre dois átomos de silício vizinhos), geminais (dois grupos hidroxila originários do mesmo átomo de silício) e isolados ou livres (um grupo hidroxila sobre um átomo de silício), como mostram as figura 1 e 2.

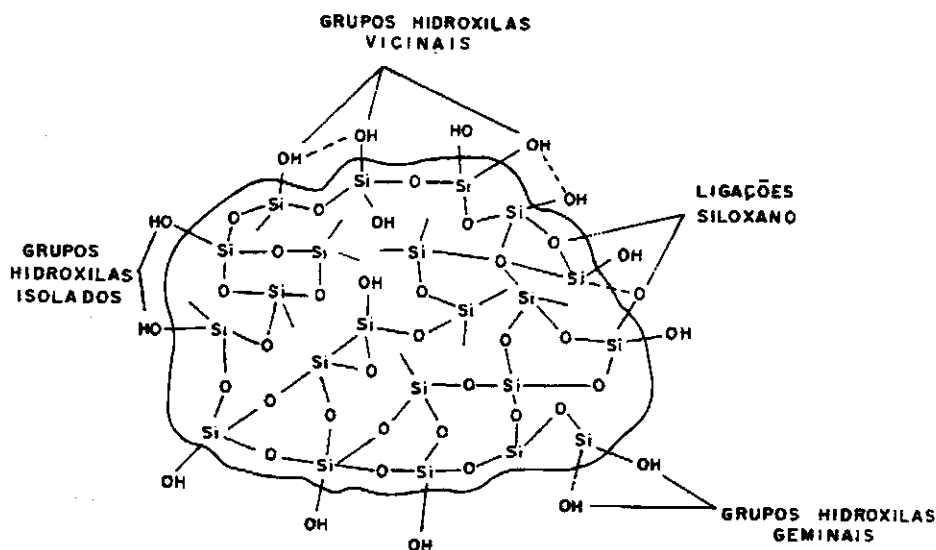


Figura 1- Estrutura da sílica-gel⁸

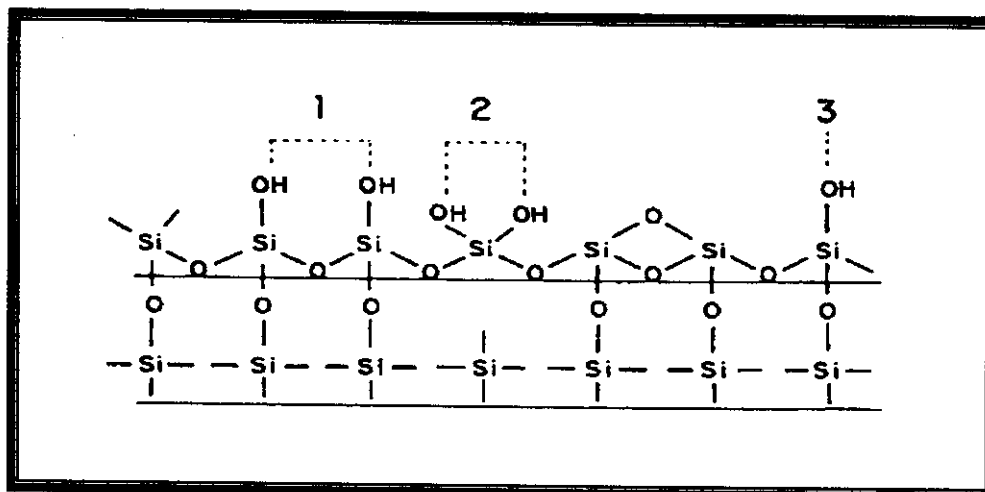


Figura 2-Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica amorfa: (1) vicinais, (2) geminais e (3) isolados⁷.

Entretanto, a sílica possui algumas limitações: seus silanóis são ácidos, e se eles não forem removidos ou cobertos, podem causar cauda nos picos ou adsorção irreversível de compostos básicos. Além disso, a sílica gel pode ser dissolvida, muito rapidamente, em soluções aquosas à valores de pH maiores que 9.

1.2- Fases quimicamente ligadas

As fases quimicamente ligadas surgiram com o objetivo de aumentar a estabilidade química das fases estacionárias utilizadas. Os recheios de fase ligada mais disponíveis atualmente são do tipo siloxano, obtidos a partir da reação dos grupos silanóis da superfície da sílica com um organossilano, de acordo com a equação química 1^{9,10}.



onde :X= cloreto ou grupo alcóxido ,
 R= cadeia alifática (ex. C8, C18)
 R' = grupos metila ou X

As reações podem ser realizadas utilizando silanos monofuncionais (um único grupo X, $XSiR_2$ R) silanos di ou trifuncionais (mais de um grupo X, X_2SiR R ou X_3SiR).

Como alternativas para melhorar as propriedades das fases estacionárias reversas surgiram as fases estacionárias monoméricas estericamente protegidas¹¹⁻¹⁵, as capeadas¹⁶, as bidentadas¹¹, as polimerizadas horizontalmente¹⁷⁻²⁰, as sintetizadas com hidreto intermediário²¹, as encapsuladas^{4,16,22-27}, as ligadas com grupo polar embutido²⁸ e as imobilizadas obtidas a partir do uso de temperatura, radiação gama, agentes reticulantes (ex. peróxidos)^{2,29-37} ou radiação microondas.

1.3-Imobilização por microondas de fases estacionárias sorvidas

Uma alternativa para minimizar os efeitos indesejáveis dos silanóis consiste em promover um recobrimento maior da superfície da sílica através da sorção do polímero sobre a sílica. Vários estudos sobre fases sorvidas têm sido desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida da UNICAMP (LABCROM), com o objetivo de promover um maior recobrimento da superfície da sílica pelo polímero.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi utilizar um novo e inédito meio de imobilização através da radiação microondas, a fim de obterem fases estacionárias com maior eficiência, estabilidade química e recobrimento do suporte cromatográfico.

A radiação microondas localiza-se no espectro eletromagnético, na região de 300 a 300.000 MHz.

De acordo com a Federal Communications Commission (EUA), foram estabelecidos quatro valores de frequência para os equipamentos de microondas empregados em operações domésticas, industriais, científicas e médicas: 915,

2450, 5800 e 22125 MHz. Destas, a de 2450 MHz é a mais utilizada em fornos de microondas domésticos e científicos³⁸⁻⁴¹.

Os fornos de microondas são compostos basicamente pelos seguintes componentes:

- Magnetron – onde as microondas são geradas.
- Guia de onda – canal retangular de metal com paredes refletoras, onde as microondas serão transportadas do magnetron para a cavidade do forno.
- Cavidade do forno – espaço interno do forno, onde as amostras serão aquecidas. A cavidade é constituída de paredes refletoras com o objetivo de prevenir possíveis vazamentos das microondas e aumentar a eficiência do forno.
- Espalhador de onda – este componente tem a função de propiciar um melhor espalhamento das microondas na cavidade do forno. Este componente não se encontra presente em forno domésticos.
- Sistema de segurança – são instalados para prevenir que o magnetron esteja em funcionamento quando as portas estiverem abertas.

A figura 3 mostra um esquema simplificado de um forno de microondas utilizado em laboratórios de pesquisas.

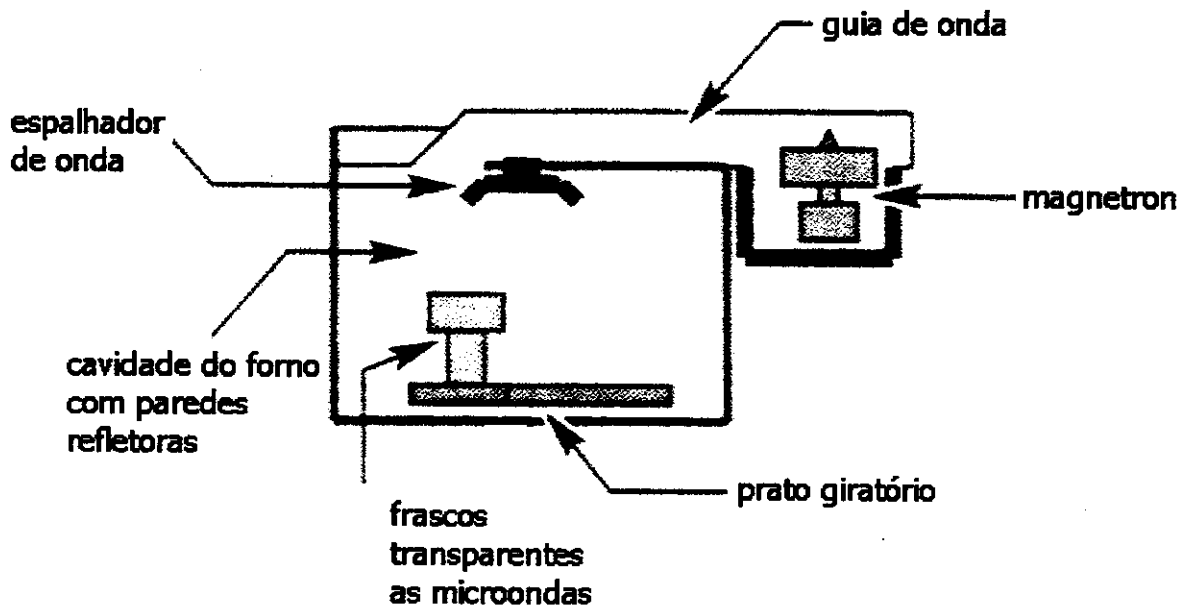


Figura 3- Diagrama simplificado de um forno microondas e seus principais componentes⁴¹.

A radiação de microondas é um tipo de energia não ionizante que causa movimento molecular pelos fenômenos de migração iônica e rotação dipolar.

A condução iônica é uma forma de migração condutiva (eletroforética) de íons dissolvidos em um campo elétrico aplicado. Esta migração consiste em um fluxo de corrente, que resulta em uma perda de I^2R (I =intensidade de corrente e R =resistência) (produção de calor) devido à resistência imposta ao fluxo. De forma geral, os parâmetros que afetam a condução iônica são a concentração, a mobilidade dos íons e a temperatura da solução^{38,41}.

Um mecanismo de condução iônica³⁹ está descrito, resumidamente, na figura 4.

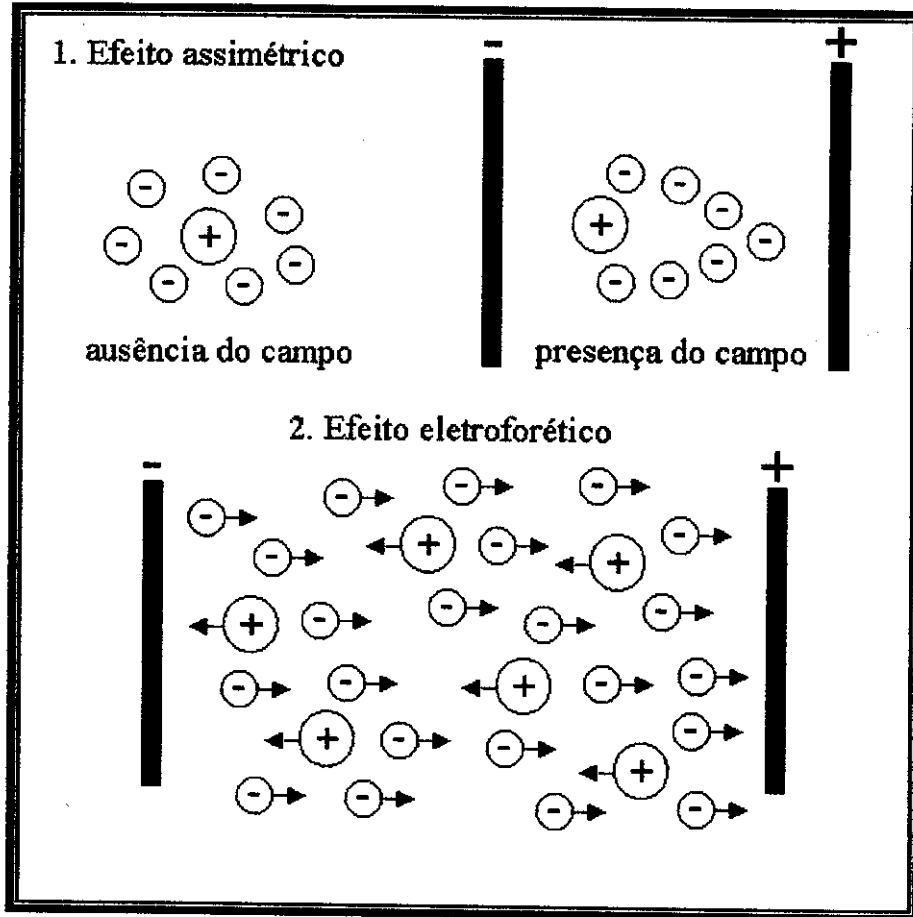


Figura 4- Mecanismo de condução iônica³⁹

A rotação dipolar é originada quando o campo elétrico da energia microondas aumenta, ocorrendo um alinhamento das moléculas polarizadas do meio.

Quando o campo decresce, devido à oscilação do mesmo, as moléculas, inicialmente polarizadas, retornam, pela própria agitação térmica, ao estado inicial de desordem, produzindo assim uma energia associada. Em uma frequência aplicada de 2450 MHz, o alinhamento e a desorganização das moléculas ocorrem cerca de 5×10^9 vezes por segundo, o que proporciona um aquecimento muito rápido.

A figura 5 mostra o mecanismo de ação das microondas através da rotação dipolar das moléculas da água.

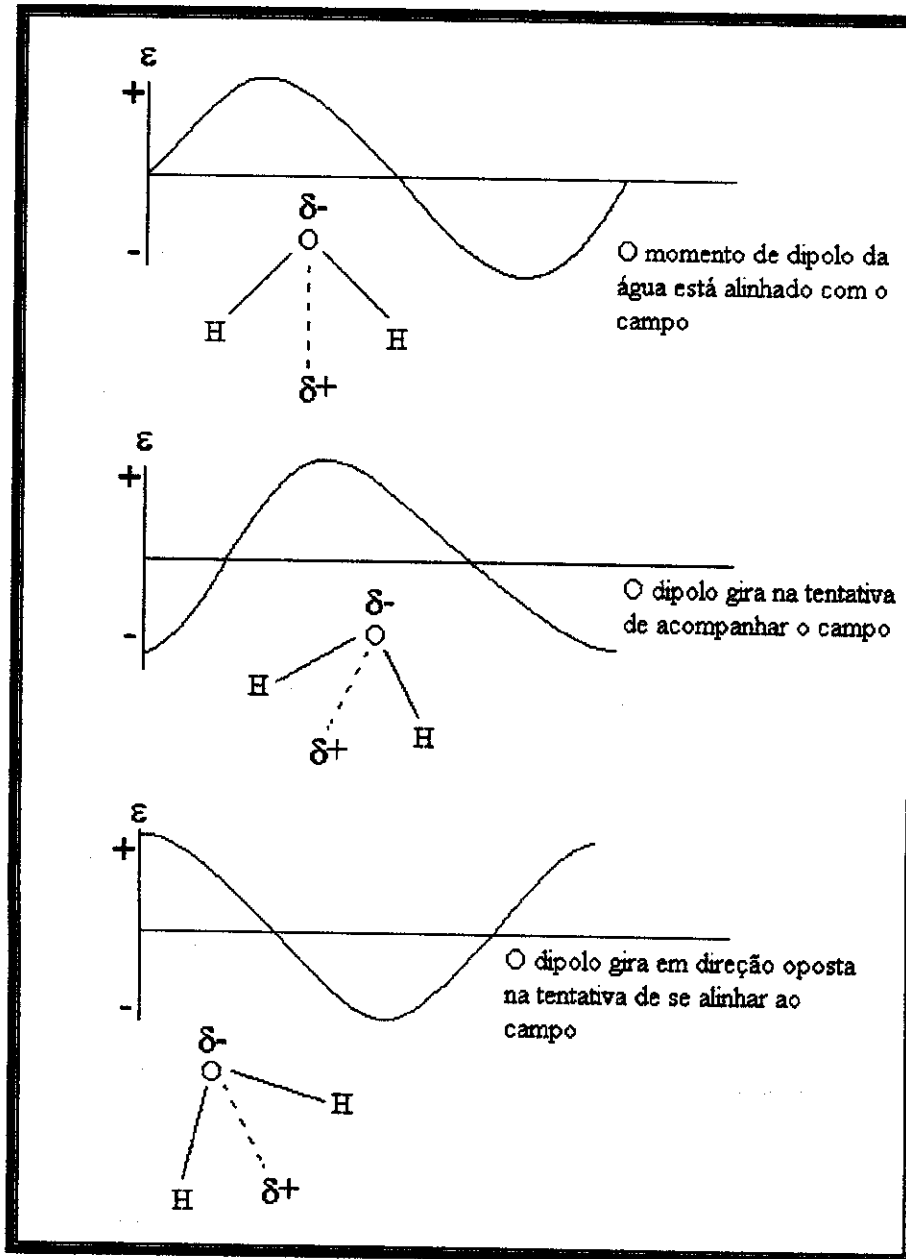


Figura 5- Mecanismo de rotação dipolar³⁹

1.4-Avaliação de colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas são avaliadas através da análise de parâmetros calculados a partir de medidas obtidas nos cromatogramas. A figura 6 mostra um cromatograma típico com as principais medidas que podem ser obtidas.

A cromatografia em coluna ocorre com um fluxo contínuo da fase móvel até que todos os componentes tenham saído da coluna. Os componentes que vão sendo eluidos passam pelo detector, cuja resposta é indicada graficamente. No cromatograma, a linha de base representa a passagem somente da fase móvel pelo detector e os picos representam o registro dos componentes eluidos.

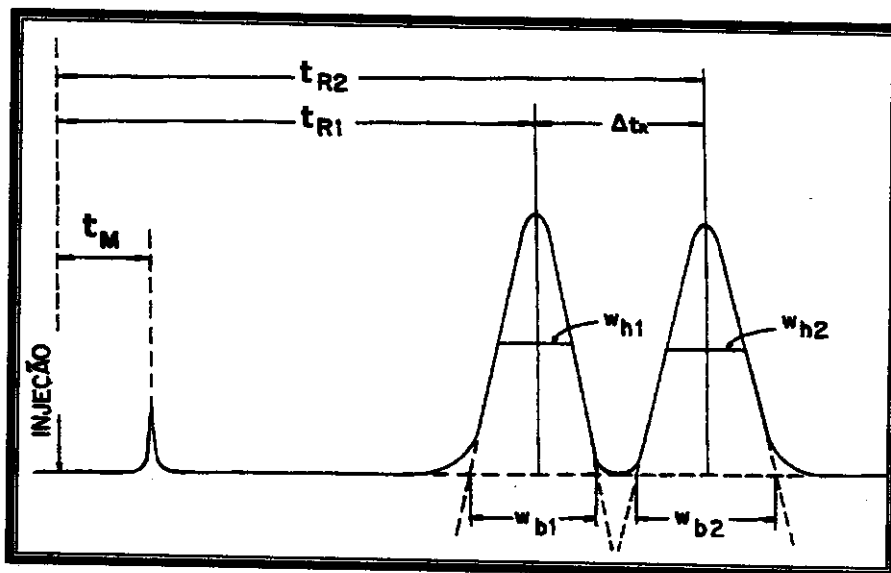


Figura 6- Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.

O tempo de retenção de um soluto, t_R , é o tempo gasto desde a injeção da amostra até a saída do componente do sistema⁴². O t_M é o tempo de retenção de um soluto não retido ou tempo de retenção da fase móvel. Tanto t_R quanto t_M podem ser obtidos diretamente do cromatograma quando se utiliza um integrador eletrônico, ou um microcomputador.

A retenção de um componente é determinada pela razão entre os tempos em que as moléculas ficam retidas na fase estacionária (t'_R) e percorrendo a coluna na fase móvel (t_M) e é representada pelo **fator de retenção (k)**:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

onde: $t'_R = t_R - t_M$ é o tempo de retenção ajustado

O valor de k , idealmente, deve estar entre 2 e 10, sendo que valores abaixo de 2 significam pouca interação do soluto com a fase estacionária e acima de 10 forte interação e, conseqüentemente, alto tempo de análise⁴³.

O parâmetro que avalia a separação entre dois picos adjacentes é a **resolução (R_s)** e é calculada a partir da diferença entre os tempos de retenção dividida pela média das larguras de suas respectivas bases (w_b):

$$R_s = 2\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}\right) = 1,177\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}\right) \quad (2)$$

onde: t_{R1} e t_{R2} são tempos de retenção dos dois picos adjacentes envolvidos no cálculo

w_{b1} e w_{b2} são larguras dos picos na base, em unidades de tempo

w_{h1} e w_{h2} são larguras dos picos à meia-altura, em unidades de tempo

Valores de R_s acima de 1,5 são considerados ideais, pois indicam uma separação entre os picos até a linha de base.

Outro parâmetro referente a separação de dois picos adjacentes é o **fator de separação (α)**, que é calculado pela razão entre os respectivos fatores de

retenção que estão, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, segundo a equação 3.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente, maior será o fator de separação. Porém, apenas o fator de separação pode não ser suficiente para avaliar a separação, pois é uma medida baseada nos tempos de retenção dos máximos dos picos e não considera a largura dos mesmos.

A **eficiência** apresentada por uma coluna é medida em termos de número de pratos, N . Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel e é calculado pela expressão:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

Isto significa que quanto mais estreito e mais retido for o pico cromatográfico, maior será a eficiência.

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo, as condições de recheio da coluna, as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o tamanho das partículas da fase estacionária e o comprimento da coluna. Para efeitos de comparação entre colunas, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

A expressão para o cálculo do número de pratos só é válida para picos simétricos. Isso faz com que a medida de simetria seja um parâmetro cromatográfico de relevância.

A simetria dos picos é avaliada pelo **fator de assimetria dos picos (A_s)**, a 10% da altura do pico, calculado como mostra a figura 7.

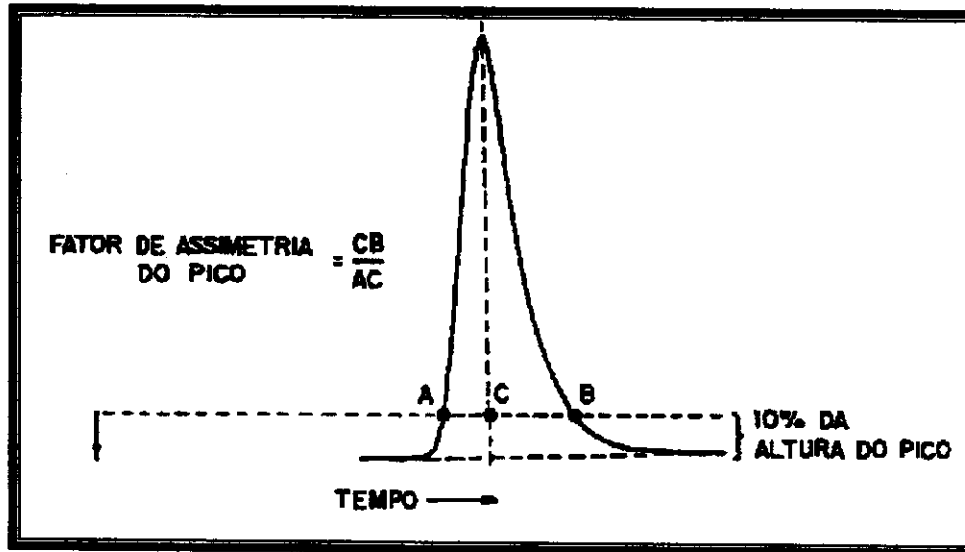


Figura 7- Medida e cálculo do fator de assimetria do pico

O valor de A_s deve estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitidos valores de até 1,6

A vazão (F) ótima de trabalho pode ser determinada pela equação de van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (5)$$

onde: H é a altura de um prato

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (6) \quad \text{é a velocidade linear da fase móvel,}$$

sendo L o comprimento da coluna

O termo A , difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos, devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Este termo pode

ser minimizado usando colunas com diâmetro interno reduzido, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. Este termo é mais importante em cromatografia gasosa que em CLAE, já que o coeficiente de difusão no líquido é muito menor que no gás.

O termo C, transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto da fase estacionária para a fase móvel. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for esta espessura, maior será o termo C e menor a eficiência da coluna.

A figura 8 mostra uma curva de van Deemter típica e a contribuição dos termos da equação 5. A curva mostra que existe uma vazão (F) ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear da fase móvel (μ), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência será máxima.

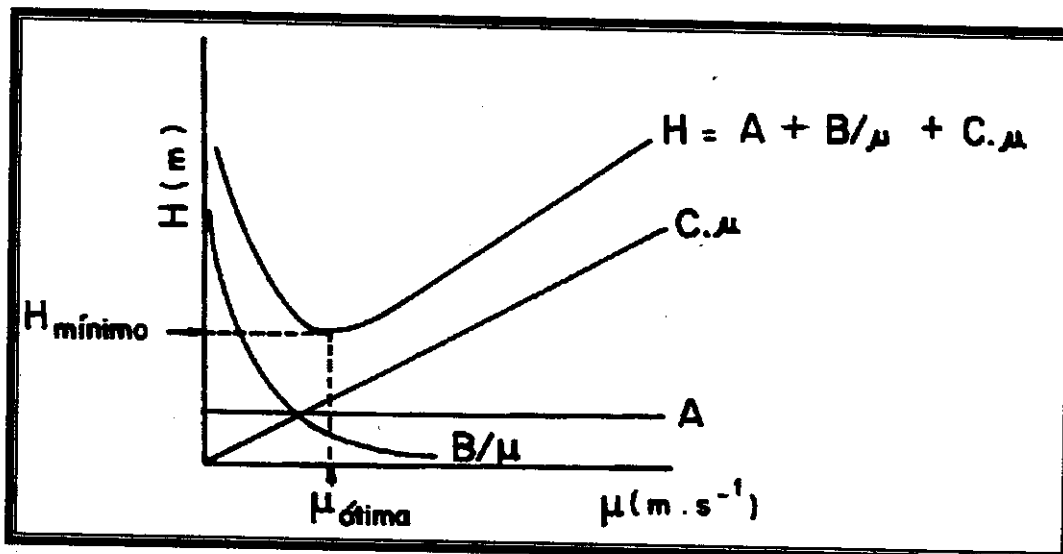


Figura 8- Curva da equação de van Deemter ³⁷

A completa avaliação de uma coluna cromatográfica passa pela análise de todos os parâmetros citados, com cuidado para que haja coerência entre os parâmetros calculados e o composto que está relacionado a estes dados. Deve-se ainda escolher compostos que caracterizem as propriedades de resolução, de retenção, de seletividade estérica, hidrofobicidade, de troca iônica e de interação silanofílica da coluna cromatográfica ⁴⁵.

1.5-Emprego da quimiometria na otimização de condições experimentais

A Quimiometria, uma das subdivisões mais recentes da química, consiste, essencialmente, na aplicação de técnicas estatísticas a problemas químicos. O pesquisador recorre à estatística para planejar detalhadamente a realização do experimento. Além de minimizar os custos operacionais, tal precaução dará a ele a garantia de que seus resultados conterão informações relevantes para a solução do problema. Se o experimento tiver sido planejado corretamente essas informações poderão ser extraídas facilmente dos resultados observados, utilizando-se métodos adequados de análises⁴⁶.

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. A primeira etapa, no planejamento de um experimento, é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo experimentador, tanto podem ser qualitativos (como tipo de catalisador), como quantitativos (como temperatura)⁴⁶.

Em seguida, é preciso definir claramente o objetivo que se pretende alcançar com os experimentos, porque isto determinará que tipo de planejamento experimental deve ser utilizado.

Um tipo de planejamento experimental muito empregado é o planejamento fatorial. Para executar um planejamento fatorial precisa-se, em primeiro lugar, especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Cada um desses experimentos em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido, é um ensaio experimental. Havendo 4 níveis num fator e 3 em outro, então serão necessários $4 \times 3 = 12$ ensaios diferentes, e o planejamento é chamado de fatorial 4×3 . Em geral, se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 níveis do fator 2,, e n_k do fator k, o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isto implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é portanto o mais simples de todos eles. Havendo k fatores, isto é, k variáveis controladas pelo experimentador, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo chamado de planejamento fatorial 2^k .

No planejamento de dois níveis costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente. O registro das respostas observadas em todas as possíveis combinações dos níveis está contido nas matrizes de planejamento, como mostra a tabela 1 ⁴⁶.

Tabela 1: Matriz de planejamento contendo o ensaio experimental, os fatores controlados (F_1 e F_2) em dois níveis (+ e -), a resposta média (R) obtida e o efeito de interação entre os fatores (F_1F_2).

Ensaio	F_1	F_2	F_1F_2	R
1	-	-	+	R_1
2	+	-	-	R_2
3	-	+	-	R_3
4	+	+	+	R_4

O cálculo dos efeitos dos fatores principais (F_1 e F_2) e de interação (F_1F_2) é dado pela diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior desse fator, de acordo com a expressão:

$$F_1 = F_2 = F_1F_2 = R_+ - R_- \quad (7)$$

No entanto, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais fatores não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, ou por meio de efeitos de interação. Por outro lado, em muitas situações, o pesquisador não conhece todos os fatores que afetam significativamente a resposta. Por isso é conveniente incluir no estudo, o maior número possível de fatores. Isso é possível usando-se planejamentos fatoriais fracionários ao invés de completos⁴⁷.

2.Objetivos

O trabalho teve como principal objetivo estudar o emprego da radiação microondas no preparo de fases estacionárias imobilizadas para CLAE. Para isso, algumas etapas foram pré-estabelecidas:

- * Preparar fases estacionárias sorvidas e imobilizadas, por meio da radiação microondas, baseadas em sílicas irregulares e esféricas, de 10 μm e 5 μm , e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS);
- * Caracterizar as fases estacionárias através de testes cromatográficos, físicos e químicos;
- * Estudar a estabilidade química das fases estacionárias preparadas a partir de partículas de 5 μm ;
- * Aplicar as fases imobilizadas preparadas em separação de multirresíduos de pesticidas e na análise de diuron e linuron presentes em amostras de urina.

3. Parte Experimental

3.1-Materiais

3.1.1-Reagentes e solventes

acetona p.a., Merck, Rio de Janeiro;
ácido nítrico, Synth;
água ultrapura, sistema Milli-Q, Millipore;
metanol, Mallinckrodt, grau HPLC;
clorofórmio, Mallinckrodt, grau HPLC;
diclorometano p.a., Merck;
etanol, Lichrosolv, Merck;
benzeno p.a., Synth;
tolueno p.a., Merck;
naftaleno p.a., Vetec química fina;
benzonitrila p.a., Riedel-de Haën;
fenol p.a., Ecibra;
N,N- dimetilanilina p.a., Quimex;

3.1.2-Gases empregados

Nitrogênio, White Martins 99,9%

3.1.3-Fase estacionária líquida

Poli(metiloctilsiloxano)(PMOS) HPLC America INC;
viscosidade (em centistokes a 25°C) = 600-1000 ;
massa molar = 6.200;
densidade relativa (a 25°C) = 0,91;

índice de refração (a 25°C) = 1,445;

tensão superficial (dina cm⁻¹) = 30,4

3.1.4-Suporte cromatográfico

Sílica Davisil (Alltech Associates), irregular, 10 μm, tamanho de poros (dp) = 6 nm, área superficial específica (S) =237 m² g⁻¹, volume de poros (Vp)=1,6 mL g⁻¹

Sílica Spherisorb (Phase Separation), esférica, 5 μm, tamanho de poros (dp) = 8 nm, área superficial específica (S) =186 m² g⁻¹, volume de poros (Vp) =0,9 mL g⁻¹

3.1.5-Pesticidas utilizados

* benomil (99,8%) - Fórmula Molecular C₁₄H₁₈N₄O₃, massa molar (g mol⁻¹) 228,3, classe toxicológica (EPA) IV (praticamente atóxico) , LD₅₀ (camundongos) 9590 mg kg⁻¹, Supelco;

* tebutiuron (99,8%) - Fórmula Molecular C₉H₁₆N₄OS, massa molar (g mol⁻¹) 290,3, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD₅₀ (camundongos) 644 mg kg⁻¹, Supelco;

* diuron (99,3%) - Fórmula Molecular C₉H₁₀Cl₂N₂O, massa molar (g mol⁻¹) 233,1, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD₅₀ (camundongos) 3400 mg kg⁻¹, Du Pont;

* linuron (99,5%) - Fórmula Molecular C₉H₁₀Cl₂N₂O₂, massa molar (g mol⁻¹) 249,1, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD₅₀ (camundongos) 14000 mg kg⁻¹, Hoescht;

* simazina (98,3%) - Fórmula Molecular C₇H₁₂ClN₅, massa molar (g mol⁻¹) 201,6, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD₅₀ (camundongos) 971 mg kg⁻¹, Novartis;

* atrazina (97,7%) - Fórmula Molecular $C_8H_{14}ClN_5$, massa molar ($g\ mol^{-1}$) 215,7, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD_{50} (camundongos) 1750 $mg\ kg^{-1}$, Novatirs;

* ametrina (96,8%) - Fórmula Molecular $C_9H_{17}N_5S$, massa molar ($g\ mol^{-1}$) 227,3, classe toxicológica (EPA) III (fracamente tóxico) , LD_{50} (camundongos) 1100 $mg\ kg^{-1}$, Novartis;

3.2-Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido, constituído de :
 - bomba de alta pressão, do tipo pistão de cabeça dupla, Shimadzu, modelo LC-10AD **(1)**;
 - detector UV/Vis, de comprimento de onda fixo (254nm), Alltech, modelo 450 UV **(2)**;
 - injetor, do tipo Rheodyne, modelo 8125, alça de amostragem 5 μL **(3)**;
 - sistema de aquisição de dados: microcomputador PC pentium II 400MHz, com software de sistema de dados cromatográficos Chrom Perfect **(4)**, representado na figura 9.
 - bomba de enchimento de colunas Haskel, com faixa de pressão disponível entre 6,9 a 344,8 MPa(1000 a 50.000 psi) modelo n°51769;
 - ultrassom, Thornton, T14;
 - agitador Roto Torque, Cole-Parmer, Modelo n°7637-01;
 - balança analítica, Fisher Scientific A-250;
 - Furadeira de bancada Schulz;
 - Forno de microondas com prato giratório CCE, modelo M-34 (900 watts);
 - Fracos de Teflon
 - Analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400;
 - Espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600;

- Espectrofotômetro Bruker ASX 300 NMR;
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM-T300.

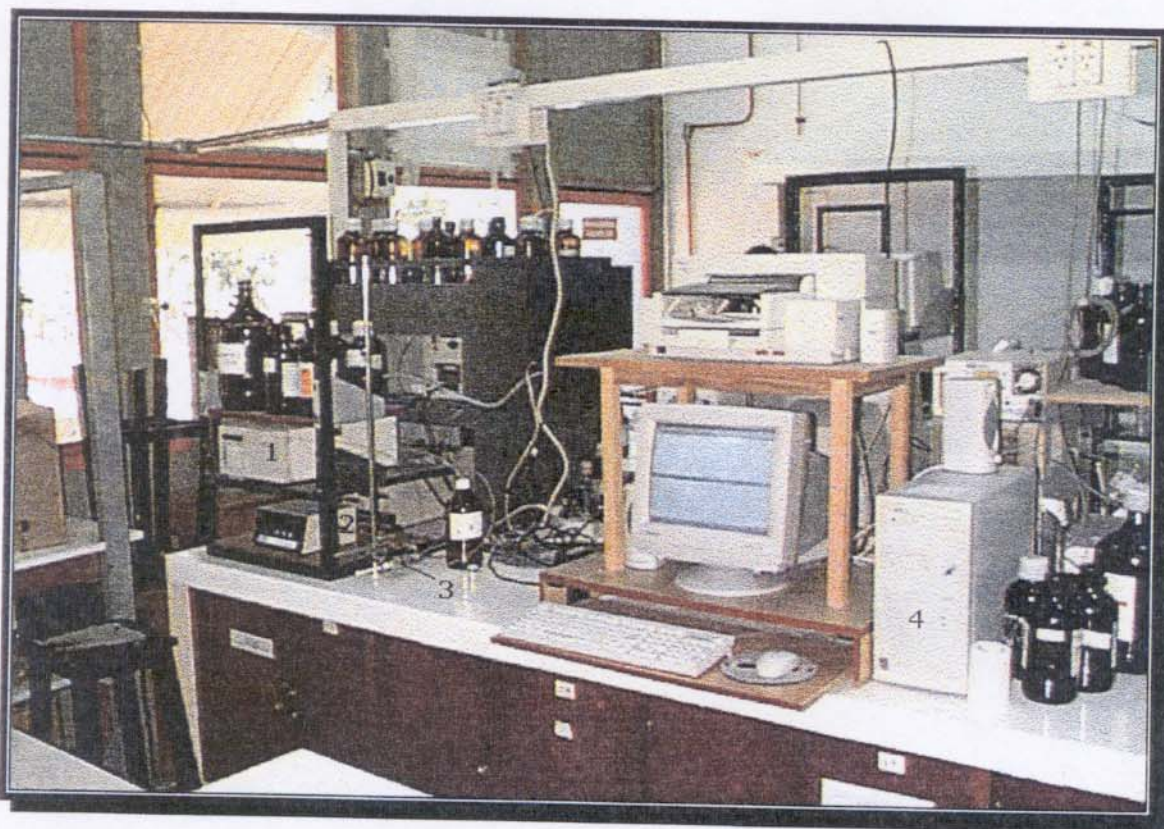


Figura 9 -Cromatógrafo a líquido e sistema de aquisição de dados utilizado no trabalho

3.2.1- Calibração do forno de microondas

A calibração do forno de microondas foi feita seguindo recomendação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environmental Protection Agency). O procedimento consistiu basicamente em aquecer 1.000 gramas de água por 120 segundos, e medir a temperatura inicial (T_i) e a temperatura final (T_f). Os experimentos foram executados nos níveis de potência de : 100, 80, 60, 40 e 20 %. Foi utilizada a equação 8 para obterem os valores reais de potência:

$$\text{Potência (W)} = k \cdot c_p \cdot m \cdot \Delta T/t \quad (8)$$

onde:

k= fator de conversão de calorias s^{-1} para watts ($k= 4,184 \text{ W cal}^{-1} \text{ s}$);

c_p = calor específico da água ($c_p= 1,00 \text{ cal g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}$);

m= massa de água em gramas;

$\Delta T= T_f - T_i$ ($^\circ\text{C}$);

t= tempo de aquecimento (s).

Os valores reais obtidos em watts para os níveis de potência estudados foram: 105 (20%), 244 (40%), 338 (60%), 495 (80%) e 638 (100%).

3.3-Confeccção e polimento das colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas foram confeccionadas na oficina mecânica da UNICAMP a partir de tubos de aço inoxidável 316. O comprimento das colunas utilizadas neste trabalho foi de 150 mm e diâmetro interno de 3,9 mm. Entretanto, para uma redução na quantidade de FE, visando uma maior economia, passou-se a trabalhar com colunas de 50 mm x 3.9mm d.i.

O corpo da coluna foi submetido a um polimento da sua superfície interna a fim de contribuir para uma melhor fluidez da fase móvel durante o enchimento como também nas análises cromatográficas.

A técnica de polimento⁴⁸ consistiu em fixar na furadeira uma haste de aço de diâmetro menor que o tubo a ser polido e envolvê-lo com palha de aço e pasta de polimento(Rubing compound, n^o7).

Após o polimento, o tubo foi deixado em repouso numa solução de ácido nítrico 10% por 15 horas, com o objetivo de formar uma camada de óxido metálico na superfície interna da coluna e assim aumentar a fluidez do líquido móvel, e em seguida lavou-a com detergente, água, acetona, água ultrapura e metanol.

3.4- Preparação da fase móvel

Os solventes utilizados para preparar a fase móvel podem conter possíveis impurezas residuais que irão provocar entupimentos nos capilares, danificar bombas e afetar o desempenho da coluna. Para minimizar esses problemas, os solventes foram previamente filtrados em uma membrana de Nylon de 0,45 μm de porosidade. Além disso a presença de bolhas de ar nas fases móveis podem causar danos na bomba e no detector. Para evitar a formação de bolhas, as fases móveis foram degaseificadas por 15 minutos em ultrassom acoplado a um sistema de vácuo. A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura MeOH/H₂O. O metanol foi escolhido como solvente orgânico da fase móvel em virtude de sua menor toxicidade e custo. A composição de fase móvel utilizada durante todo o trabalho foi 70:30 v/v metanol:água, estabelecida anteriormente por Anazawa².

3.5-Preparação do material de recheio

3.5.1-Quantidade de fase estacionária líquida sobre o suporte

A porcentagem de carga de fase estacionária líquida utilizada para preparar as fases estacionárias com partículas de sílica de 10 μm , foi de 50 % (m/m), considerando o melhor valor obtido nos estudos feitos por Anazawa².

Para fases estacionárias preparadas a partir de sílica de 5 μm foram analisadas porcentagens de carga de 30 % (m/m) e 40 % (m/m) empregando um planejamento fatorial, uma vez que 50 % resultou em uma fase com grande excesso de polímero.

3.5.2-Solvente de preparação da fase estacionária

Escolheu-se o diclorometano como solvente para ser utilizado na preparação do material de recheio, pois este solvente além de solubilizar o polímero apresenta volatilidade suficiente para ser removido por simples evaporação e também por ter sido utilizado nos trabalhos de Anazawa² e de Ohmacht et al.³²

3.5.3-Procedimento de preparação da fase estacionária

O recobrimento do suporte pela fase líquida foi realizado utilizando o método da evaporação do solvente³⁷.

Este método consistiu em dissolver uma determinada quantidade de PMOS em um volume adequado de diclorometano, obedecendo a relação: 5g de fase estacionária para 60 mL de solvente de dissolução. A sílica foi adicionada à solução PMOS+diclorometano, de acordo com a relação citada acima. Esta adição foi feita lentamente, sob agitação, para permitir que todas as partículas do suporte ficassem em contato com a fase líquida dissolvida em diclorometano. A mistura de fase estacionária líquida, solvente e suporte foi mantida sob agitação durante 3 horas. Com o término da agitação, a mistura foi mantida em repouso, em capela, para promover a evaporação do solvente.

Neste trabalho usou-se a sílica ativada a 150⁰C por 24 horas e a sílica não submetida a etapa de ativação. A ativação da superfície da sílica é feita com o intuito de deixar livre os grupos silanóis da sílica, através da remoção das moléculas de água adsorvidas fisicamente. Usou-se a sílica sem ativação porque se sabe que a presença das moléculas de água na superfície da sílica contribuem para acentuar o fenômeno de rotação dipolar das microondas, promovendo um aquecimento maior da fase estacionária, trazendo como consequência uma maior imobilização.

3.6-Irradiação das fases estacionárias por microondas

As fases estacionárias preparadas foram previamente pesadas e transferidas para frascos de teflon e em seguida irradiadas em forno de microondas variando-se o tempo e a potência, com o objetivo de estabelecer estes parâmetros que resultassem em maior eficiência das fases imobilizadas.

A utilização de frascos de teflon para a irradiação em microondas é indispensável já que esses materiais são transparentes a esse tipo de irradiação. Na figura 10 visualiza-se a interação da radiação microondas com três tipos de materiais⁴⁰.



Figura 10- Interação da radiação microondas com os materiais⁴⁰

3.7-Estudo da influência da ativação do suporte cromatográfico, tempo de irradiação e presença de solvente orgânico na preparação de fases baseadas em sílica Davisil, 10 μm e PMOS

Inicialmente foram testadas várias condições de preparo das fases estacionárias imobilizadas por microondas. Neste estudo os três parâmetros analisados foram: ativação do suporte cromatográfico, irradiação das fases na presença de solvente orgânico, diclorometano (CH_2Cl_2), e tempo de irradiação (t_i). Foram preparados quatro lotes de fases estacionárias utilizando-se o procedimento citado no item 3.5.3 e as condições apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Condições empregadas no preparo das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, 10 μm , imobilizadas por microondas

Fases estacionárias	Condições de preparo
A	Sílica ativada, $t_i = 6$ min, presença de solvente CH_2Cl_2 (78 mL)
B	Sílica não ativada, $t_i = 6$ min, presença de solvente CH_2Cl_2 (78 mL)
C	Sílica ativada, $t_i = 15$ min, ausência de solvente CH_2Cl_2
D	Sílica não ativada, $t_i = 15$ min, ausência de solvente CH_2Cl_2

As fases imobilizadas na presença de solvente orgânico foram submetidas a um tempo de irradiação menor devido a ebulição do solvente orgânico, que pode resultar em uma perda significativa do material preparado.

3.8-Estudo da presença de quantidades adicionais de água no suporte cromatográfico

Esse estudo foi realizado com o intuito de verificar se uma quantidade maior de água presente no suporte cromatográfico iria contribuir para um aquecimento mais intenso da fase estacionária, favorecendo a imobilização.

O procedimento adotado consistiu em: adicionar 6 g de sílica a 30 mL de água ultrapura, a seguir filtrar a solução em papel de filtro (Whatman Inc.) e lavar a sílica com duas porções de 10 mL de metanol, para facilitar sua secagem.

A sílica tratada com água foi adicionada a solução de polímero e solvente de dissolução, seguindo o procedimento descrito no item 3.5.3.

3.9-Preparo da suspensão

O solvente de suspensão tem a função de impedir a aglomeração de partículas, mantendo-as dispersas através da redução da intensidade das forças eletrostáticas de interação e de impedir a sedimentação das partículas, através da escolha de um solvente ou mistura de solventes com densidade aproximadamente igual à das partículas. Neste trabalho usou-se clorofórmio como solvente de suspensão.

A suspensão foi preparada em um tubo com tampa de rosca, pesando-se uma massa de fase estacionária suficiente para recheiar a coluna, acrescida de um leve excesso (~20 %) e adicionado o solvente de suspensão. A concentração da suspensão foi de 10% (m/v) baseada em outros trabalhos do laboratório de cromatografia líquida da UNICAMP (LABCROM)⁴⁵, para partículas de 10 µm e 10 % (m/v) e 20 % (m/v) para partículas de 5 µm. Após preparada a suspensão, submeteu-a à agitação em um agitador Roto-Torque por 4 ou 16 horas.

3.10-Procedimento de enchimento e condicionamento de colunas cromatográficas

O procedimento de enchimento de colunas utilizado está descrito à seguir:

- * transferiu-se a suspensão de enchimento para o reservatório da bomba de enchimento e a seguir completou-se o volume do reservatório com clorofórmio;
- * Ao reservatório conectou-se a coluna que possuía um filtro poroso em sua extremidade oposta;
- * Ligou-se a bomba de enchimento, abrindo a válvula de gás nitrogênio (34,5 MPa) e a válvula do solvente, já previamente pressurizada, e coletaram-se, em uma proveta, 100 mL de solvente de suspensão + solvente de propulsão (metanol);
- * Desligou-se a bomba fechando as duas válvulas citadas anteriormente;
- * Deixou-se a coluna em repouso por dez minutos para despressurização;
- * Finalmente a coluna foi desconectada da bomba, e os acessórios (reductor, filtro e terminal) foram adaptados a outra extremidade da coluna.

Após o enchimento, as colunas foram condicionadas acoplando-as a uma bomba e passando a fase móvel MeOH/H₂O 70:30 v/v a uma vazão de 0,2 mL/min, por duas horas, com a finalidade de estabelecer uma melhor condição de equilíbrio entre a fase móvel e a estacionária. A figura 11 apresenta um esquema da aparelhagem utilizada para o enchimento das colunas. A fotografia, representada na figura 12, permite visualizar, mais realisticamente, o sistema de enchimento empregado no LABCROM.

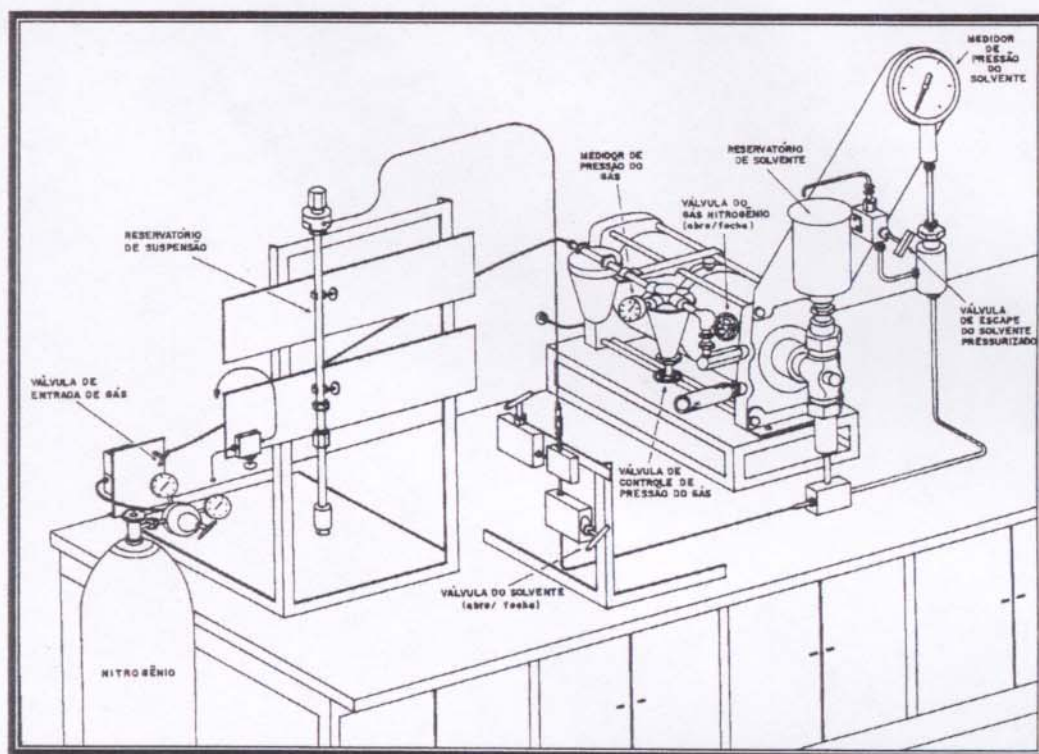


Figura 11- Esquema geral do sistema de enchimento utilizado

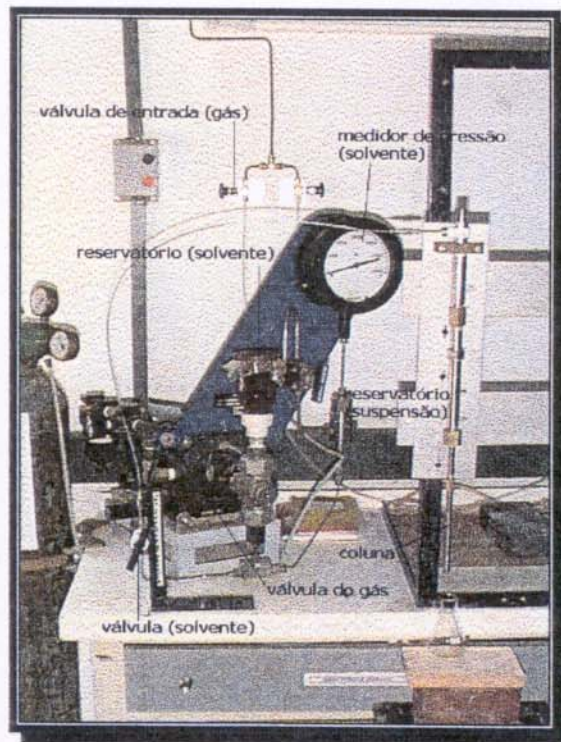


Figura 12 - Sistema de enchimento de colunas utilizado no LABCROM

3.11-Preparo de fases estacionárias baseadas em sílica Spherisorb, 5 μm , e PMOS

3.11.1-Estudo da extração da FE imobilizada

O procedimento de preparo de fases estacionárias, descrito no item 3.5.3, usando uma carga de 50% de polímero, foi empregado no preparo de fases SiO_2 (PMOS) a partir de sílica Spherisorb de 5 μm . Entretanto, visualmente, observou-se que havia um grande excesso de polímero. Um grande excesso de polímero sorvido na sílica pode comprometer a eficiência das fases estacionárias, devido a uma menor velocidade de transferência de massa do soluto entre a FE e FM. Alguns resultados, obtidos em nosso grupo de pesquisas, também comprovaram esse fato negativo para porcentagem de 50% de carga de PMOS sorvido sobre partículas de 5 μm , onde se tornou impraticável o manuseio dessas fases preparadas. Por esse motivo, fez-se necessário um estudo de diferentes condições de extração com a finalidade de eliminar o excesso de polímero, obtendo, dessa forma, fases estacionárias que apresentassem boa eficiência, estabilidade e reprodutibilidade.

Foram propostas três condições de extração baseadas em estudos do nosso grupo de pesquisa⁴⁹ descritas a seguir:

Condição 1-Extração com hexano (96 mL) à uma vazão de 0,4 mL/min;
Condição 2-Extração com hexano (720 mL) à uma vazão de 3,0 mL/min;
Condição 3-Extração com clorofórmio (30 mL) e metanol (70 mL) à uma pressão de 34,5 MPa.

As condições 1 e 2 foram realizadas utilizando uma bomba de alta pressão, do tipo pistão de cabeça dupla, Waters, modelo 510, enquanto que a condição 3 foi efetuada em uma bomba de enchimento de coluna Haskel.

As fases estacionárias submetidas a essas condições de extração foram imobilizadas anteriormente em forno de microondas por 900 segundos, à uma potência de 495 watts.

3.11.2-Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}

A partir dos resultados obtidos no estudo de extração das fases estacionárias foi proposto um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , que visou estudar alguns fatores importantes para definir uma metodologia de preparo de fases estacionárias a partir de sílica de $5\mu\text{m}$ e PMOS sorvido e imobilizado por microondas, tendo como base as condições pré-determinadas no preparo de fases $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ com sílica de $10\mu\text{m}$. Este tipo de planejamento fatorial foi proposto porque além de ser representativo de um fatorial completo, consome poucas etapas para ser concluído, contribuindo para uma economia de reagentes e de tempo do analista. O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} está apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Efeitos, fatores e níveis selecionados na aplicação do planejamento fatorial 2^{4-1}

Efeitos	Fatores	Níveis	
		-	+
1	Carga de PMOS (%) (m/m)	30	40
2	Concentração da suspensão (%) (m/v)	10	20
3	Pressão de enchimento (MPa)	34,5	48,3
4	Tempo de agitação (horas)	4	16

3.12- Caracterização das fases estacionárias

Os suportes cromatográficos e as fases estacionárias preparadas foram submetidos a análise elementar de carbono, espectroscopia no infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), área superficial específica (A_{BET}) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todas as análises foram realizadas em laboratórios do IQ/UNICAMP, com exceção das medidas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear efetuadas na Universidade de Tübingen, Alemanha, pelo Dr. Stefan Bachmann.

3.12.1- Análise elementar de carbono

As fases estacionárias sorvidas preparadas a partir de partículas de sílica de 5 μm e 10 μm e PMOS e as correspondentes imobilizadas por meio de radiação microondas a uma potência de 495 watts, por 900 segundos foram submetidas a análise de carbono antes e após o enchimento das colunas, com o objetivo de avaliar a quantidade de carbono presente inicialmente e a quantidade remanescente após o enchimento, ou seja, a quantidade de carbono sorvida ou imobilizada por microondas. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO_2 que é então medido em função de sua condutividade térmica. O aparelho utilizado foi um analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400.

3.12.2- Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os suportes e as fases estacionárias preparadas foram submetidos a espectroscopia no infravermelho com o objetivo de avaliar, qualitativamente, a eficiência no recobrimento do suporte pelo PMOS, através da presença de bandas características dos grupos hidroxilas presentes na sílica.

Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600.

As análises foram realizadas preparando-se pastilhas de KBr com as amostras das fases estacionárias e dos suportes cromatográficos.

3.12.3-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As fases estacionárias foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear com polarização cruzada segundo ângulo mágico (^{29}Si), utilizando um espectrofotômetro Bruker ASX 300 NMR, com o objetivo de avaliar possíveis ligações entre o suporte e o PMOS e alterações químicas causadas pelo processo de imobilização por radiação microondas.

Os espectros foram obtidos com tempo de contato de polarização de 5 ms e intervalo de pulso de 1 s. As amostras foram agitadas em 3500 Hz em um rotor de ZrO_2 de 7 mm.

3.12.4-Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro e então examinadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM-T300 operado à 20kV. Foram analisadas amostras do suporte cromatográfico, suporte recoberto com PMOS e irradiado em microondas e suporte cromatográfico recoberto com PMOS, irradiado em microondas e extraído em bomba de enchimento Haskel. As fotografias foram tiradas com aumento de 5000 vezes.

3.13-Avaliação das colunas

As colunas foram avaliadas através dos parâmetros cromatográficos N/m , k , R_s e A_s . Para isto, uma mistura orgânica sintética foi utilizada:

Mistura teste 1: uracila (composto não retido), acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno.

Para o teste de estabilidade foi utilizada uma mistura de compostos ácidos, básicos e neutros:

Mistura teste 2 : uracila (composto não retido), fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno.

As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram: fase móvel MeOH/H₂O 70:30 v/v, volume de injeção de 10 µL e detecção UV em 254 nm.

3.14- Estabilidade química das FE

As colunas recheadas com as fases estacionárias sorvidas, preparadas a partir de sílica Spherisorb 5 µm e PMOS, e imobilizadas por microondas a potência de 495 watts, por 900 segundos foram submetidas a avaliação de estabilidade química em fase móvel neutra, de acordo com um novo procedimento estudado em nosso grupo de pesquisas^{50,51}. Inicialmente, passou-se através da coluna uma fase móvel neutra, Metanol: água numa proporção de 50:50 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Após a passagem de 50 mL de fase móvel, injetava-se a mistura teste 2 e analisava-a na melhor vazão de trabalho (0,3 mL min⁻¹), obtida através da curva de van Deemter construída a partir dos dados obtidos para o naftaleno. Este procedimento foi repetido até alcançar 3750 mL de fase móvel.

O mesmo de procedimento de avaliação de estabilidade química foi aplicado para uma coluna recheada com fase estacionária comercial (Rainin 5µm, quimicamente ligada) até 3750 mL de fase móvel neutra, para comparar o tempo de vida útil das colunas por nós preparadas com as disponíveis no comércio.

3.15-Aplicação em análise de pesticidas das colunas recheadas com fases estacionárias imobilizadas por microondas

Foram realizados dois tipos de aplicações. Em uma delas, estudou-se a potencialidade da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ $5\mu\text{m}$, imobilizada por radiação microondas, na separação de uma amostra de multirresíduos de pesticidas, a saber, benomil, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina, usando a fase móvel acetonitrila/água 35:65 (v/v). Para comparação com as fases estacionárias disponíveis comercialmente fez-se a separação da mesma mistura utilizando uma coluna recheada com fase estacionária Rainin C-8, $5\mu\text{m}$. Este estudo foi realizado em um cromatógrafo a líquido composto por uma bomba de alta pressão do tipo pistão cabeça dupla Waters modelo 510, com detector espectrofotométrico UV-Vis de comprimento de onda variável, Waters modelo 48 e, injetor pneumático SSI 3XL com alça de amostragem $10\mu\text{L}$ modelo 02-0240.

Em uma outra aplicação, feita em colaboração com uma aluna de doutorado Joseane Montagner Pozzebon, avaliou-se a separação de uma mistura de dois herbicidas, pertencentes à classe das uréias substituídas, ou seja diuron e linuron, presentes em amostras de fluido biológico (urina). Para extrair os herbicidas da matriz estudada, urina, e pré-concentrá-los, uma vez que se encontram em concentrações muito baixas, empregou-se a extração em fase sólida. Para isto foram utilizados tubos $\text{SiO}_2(\text{PMODS})$ $40\mu\text{m}$, preparados em nosso próprio laboratório. Três parâmetros de validação de metodologia analítica, a recuperação, curva analítica e limite de quantificação foram calculados. Este estudo de aplicação da coluna cromatográfica preparada por nós em análise de pesticidas na urina foi feito em uma bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla Waters modelo 510, com detector espectrofotométrico UV-Vis de comprimento de onda variável Waters modelo 486, injetor Rheodyne, modelo 7125 com alça de amostragem $10\mu\text{L}$. A detecção UV foi feita em 235 nm.

4. Resultados e Discussão

4.1-Estudo da influência da ativação do suporte cromatográfico, tempo de irradiação e presença do solvente orgânico na preparação de fases baseadas em sílica DAVISIL, 10 μm , e PMOS

Os resultados obtidos nos estudos sobre a ativação ou não do suporte cromatográfico de sílica de 10 μm , bem como a influência do tempo de irradiação e da presença do solvente orgânico na preparação de FE SiO_2 (PMOS) imobilizada por microondas, a uma potência de 338 watts podem ser visualizados na figura 13. Na tabela 4 estão apresentados os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos.

Tabela 4. Influência da ativação do suporte, presença de solvente orgânico e tempo de irradiação nos parâmetros cromatográficos obtidos com as FE SiO_2 (PMOS) sobre sílica de 10 μm

Fases estacionárias	N/m (m^{-1})*	A_s *	k*	R_s **
Si ativada; CH_2Cl_2 ; $t_i=360\text{s}$; P= 338 watts	22.080	1,9	2,3	2,2
Si não ativada; CH_2Cl_2 ; $t_i=360\text{s}$; P= 338 watts	26.220	1,8	2,3	2,5
Si ativada; $t_i=900\text{s}$; P= 338 watts	26.720	1,7	2,6	2,3
Si não ativada; $t_i=900\text{s}$; P=338 watts	33.150	1,3	2,6	2,8

*calculado para o naftaleno (composto mais retido), ** calculado para o par tolueno/naftaleno
Si = sílica, t_i =tempo de irradiação, P=potência

Os valores apresentados na tabela 4 e figura 13 mostram que para preparar fases estacionárias imobilizadas por microondas não é necessário submeter a sílica a uma etapa de ativação para a remoção de água, já que a presença dessas moléculas contribui para o aquecimento da fase estacionária, fazendo com que o processo de imobilização seja mais efetivo. Além disso a água possui um momento dipolar maior que os dos solventes orgânicos utilizados para o preparo das fases. Este fator é muito importante de acordo com o fenômeno de rotação dipolar descrito anteriormente. Também não se faz necessária a presença do CH_2Cl_2 no

processo de irradiação por microondas, uma vez que além de não contribuir para o aumento da eficiência, impede que se use tempos mais longos de irradiação, devido a ebulição do solvente, com conseqüente evaporação, o que conduz a secagem da fase estacionária.

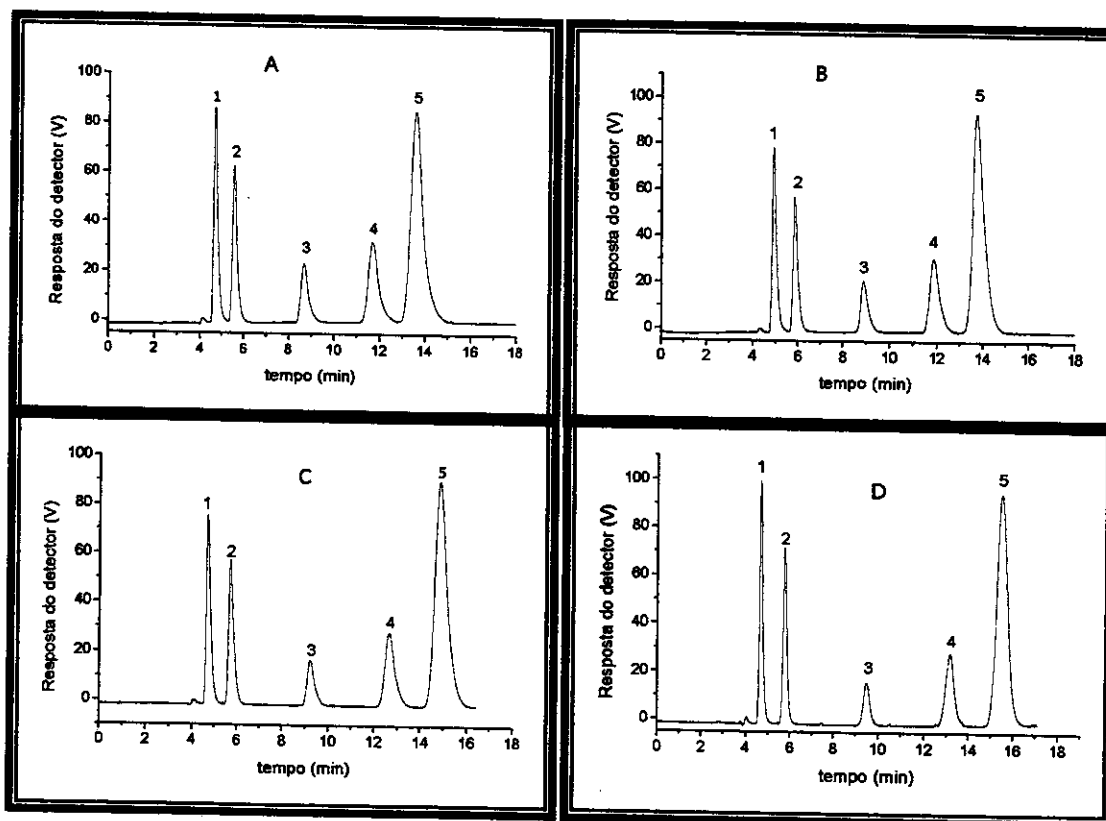


Figura 13- Cromatogramas sobre a influência da ativação do suporte, presença de solvente orgânico na irradiação e tempo de irradiação

A- F.E = sílica 10 μm ativada (150°C por 24h) + PMOS.

Irradiação na presença de solvente CH_2Cl_2 ; $t_i=360$ s (secura) e $P= 338$ W.

B- F.E = sílica 10 μm sem ativação + PMOS. Irradiação na presença de solvente CH_2Cl_2 ; $t_i=360$ s e $P= 338$ W.

C- F.E = sílica 10 μm ativada (150°C por 24h) + PMOS. Irradiação após evaporação do solvente CH_2Cl_2 ; $t_i=900$ s e $P= 495$ W.

D- F.E = sílica 10 μm sem ativação + PMOS. Irradiação após evaporação do solvente CH_2Cl_2 ; $t_i=900$ s e $P= 495$ W.

Condições cromatográficas: Colunas 150 mm x 3,9 mm d.i.; vazão 0,3 mL min^{-1} ; FM Metanol:água 70:30 v/v; volume de injeção 10 μL e detecção UV em 254 nm.

Mistura padrão: 1-acetona; 2-benzonitrila; 3-benzeno; 4-tolueno; 5-naftaleno.

4.2-Estudo da presença de quantidades adicionais de água sorvida no suporte cromatográfico

O procedimento utilizado para esse estudo foi descrito no item 3.8 da parte experimental e os resultados obtidos estão apresentados na figura 14 e na tabela 5.

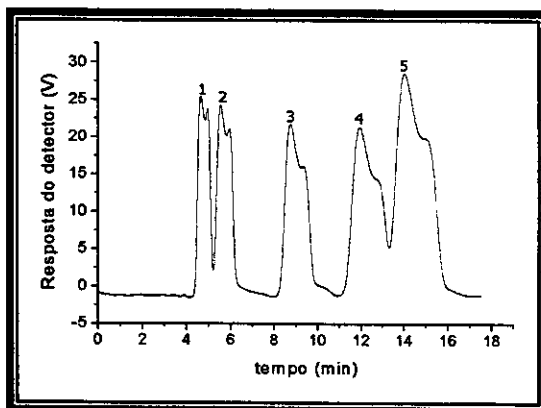


Figura 14- Cromatograma obtido com a FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $10 \mu\text{m}$, (Si tratada com H_2O) e imobilizada em $P= 338 \text{ W}$ e $t_i= 360\text{s}$

Condições cromatográficas: Colunas $150 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm d.i.}$; vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; FM Metanol:água $70:30 \text{ v/v}$; volume de injeção $5 \mu\text{L}$ e detecção UV em 254 nm .

Mistura padrão: 1-acetona; 2-benzonitrila; 3-benzeno; 4-tolueno; 5-naftaleno.

Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos para a FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $10 \mu\text{m}$, (Si tratada com H_2O) e irradiada por um tempo de 360 s e potência de 338 W

Fase estacionária	$N/m \text{ (m}^{-1}\text{)}^*$	A_s^*	k^*	R_s^{**}
$\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{PMOS})$	3.950	n.d	2,8	0,8

*calculado para o naftaleno (composto mais retido), ** calculado para o par tolueno/naftaleno
n.d = não determinado

No cromatograma pode-se observar que não houve boa separação dos componentes da mistura teste, além dos picos se apresentarem duplos e com caudas bastante pronunciadas. Isso pode ter ocorrido devido a uma deposição heterogênea do polímero sobre o suporte de sílica, uma vez que não se observou grandes alterações na retenção dos solutos analisados.

4.3-Otimização dos parâmetros envolvidos no preparo das fases imobilizadas por microondas

Na tabela 6 estão os parâmetros cromatográficos obtidos variando o tempo de irradiação e a potência do forno de microondas empregando sílica de 10 μ m e o procedimento descrito no item 3.5.3 da parte experimental.

Na figura 15 podem ser visualizados dois cromatogramas comparando fase sorvida (sem irradiação) com a fase estacionária imobilizada por microondas por um tempo de 900 s e potência de 495 watts.

Tabela 6. Influência da potência e tempo de irradiação nos parâmetros cromatográficos de FE SiO₂(PMOS) sobre sílica de 10 μ m

Tempo de irradiação (s)	Potência (W)	N/m (m ⁻¹)*	A _s *	k*	R _s **
0	0	22.330	1,5	3,1	2,2
30	495	27.150	1,5	3,1	2,7
150	495	27.920	1,2	4,1	3,1
300	495	33.670	1,3	2,7	2,6
600	495	30.490	0,9	3,2	2,9
900	495	40.660	1,1	3,2	3,2
300	638	33.090	1,5	2,7	2,5
600	638	30.630	1,3	3,0	2,8
900	638	32.370	1,4	3,0	3,0

*calculado para o naftaleno (composto mais retido), ** calculado para o par tolueno/naftaleno

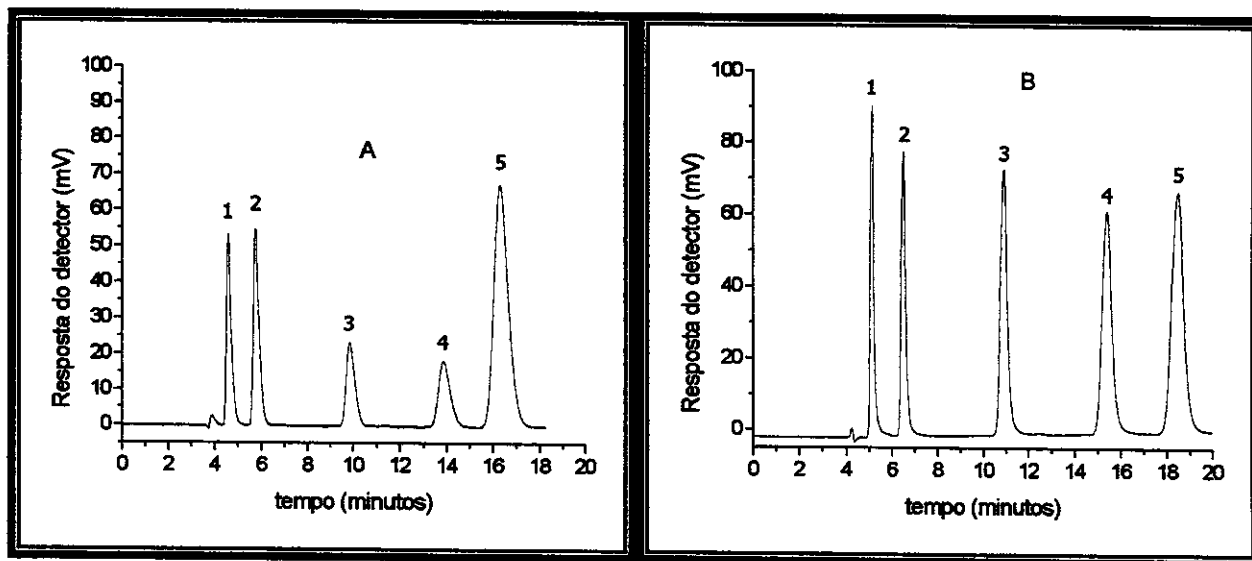


Figura 15- Cromatogramas de fases estacionárias baseadas em sílica 10 μm e PMOS A) sorvida e B) imobilizada em microondas, $t_i=900$ s e $P=495$ W. Condições cromatográficas: colunas 150 mm x 3,9 mm d.i.; vazão 0,3 mL min^{-1} ; FM Metanol:água 70:30 v/v; volume de injeção 5 μL e detecção UV em 254 nm. Mistura padrão: 1-acetona; 2-benzonitrila; 3-benzeno; 4-tolueno; 5-naftaleno.

Analisando a tabela 6 e a figura 15 verifica-se que após a irradiação por microondas um valor mais elevado de eficiência da coluna é obtido oriundo, provavelmente, de uma distribuição mais homogênea do polímero, uma vez que para a maioria das FE imobilizadas houve também melhora no fator de assimetria.

Com base nos valores obtidos, escolheu-se como tempo de irradiação 900 segundos e potência de 495 watts para serem empregados no preparo de fases estacionárias imobilizadas por microondas, com partículas de sílica de 10 μm de tamanho. A vazão de 0,3 mL min^{-1} foi escolhida com base na curva de van Deemter construída para coluna recheada com fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, irradiada por 900 segundos, a uma potência de 495 watts. A curva de van Deemter obtida está representada na figura 16.

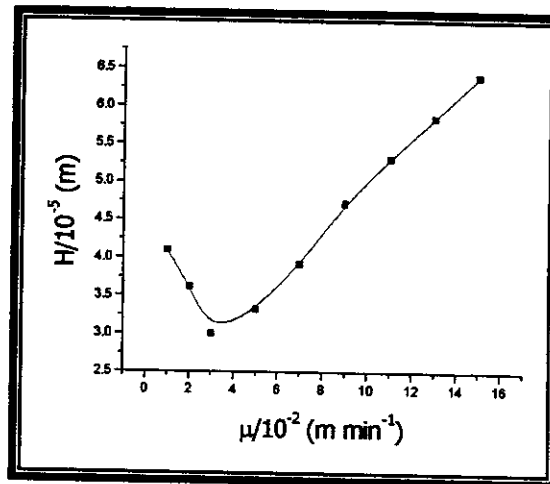


Figura 16- Curva de van Deemter para coluna recheada com FE SiO_2 (PMOS) imobilizada por microondas utilizando $t_i = 900 \text{ s}$, $P = 495 \text{ W}$.

4.4-Preparo de FE baseadas em sílica Spherisorb, $5 \mu\text{m}$, e PMOS

4.4.1-Estudo da extração da FE imobilizada

Os parâmetros cromatográficos obtidos com as FE SiO_2 (PMOS), $5 \mu\text{m}$, imobilizadas em microondas à $P = 495 \text{ watts}$ e $t_i = 900 \text{ segundos}$ estão contidos na tabela 7 e os respectivos cromatogramas podem ser visualizados na figura 17.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos das fases estacionárias SiO_2 (PMOS), $5 \mu\text{m}$, imobilizadas por microondas e submetidas à três condições de extração

Coluna	$N/m \text{ (m}^{-1}\text{)}^*$	A_s^*	k^*	R_s^{**}
Sem extração	44.000	2.3	3.5	2,2
hexano $0,4 \text{ mL min}^{-1}$	77.700	1.9	3.0	2,7
hexano $3,0 \text{ mL min}^{-1}$	27.410	0.7	2.9	1,7
CHCl_3 e CH_3OH $34,5 \text{ MPa}$	94.550	1.5	2.9	2,9

*calculado para o naftaleno (composto mais retido) ** calculado para o par tolueno/naftaleno

Através dos resultados mostrados na tabela 7 e da análise dos cromatogramas apresentados na figura 17, pode-se verificar que as condições de extração testadas foram eficientes, com exceção do uso de hexano a uma vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Isso pode ter acontecido, provavelmente, porque nessa condição, além da utilização de um solvente forte, a extração foi realizada à uma vazão muito alta, o que pode ter ocasionado uma desorganização do polímero nos poros da sílica.

4.4.2-Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}

O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi proposto para estabelecer uma metodologia de preparo de fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, com partículas de $5 \mu\text{m}$ ainda pouco estudadas pelo nosso grupo de pesquisa. Na tabela 8 são mostrados os resultados obtidos para o fatorial fracionário, onde se verificou o efeito de quatro fatores, carga de PMOS, concentração da suspensão, tempo de agitação da suspensão e pressão de enchimento no preparo das colunas $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $5\mu\text{m}$, immobilizadas por microondas à potência de 495 watts, por 900 segundos. Na tabela 9 são mostrados os efeitos calculados para os fatores estudados em relação a um fatorial completo 2^4 .

Através dos resultados obtidos na análise do planejamento fatorial 2^{4-1} para fases estacionárias preparadas a partir da imobilização do PMOS sobre o suporte de sílica Spherisorb de $5 \mu\text{m}$, pode-se observar que os contrastes referentes aos efeitos principais 1 e 2, carga de PMOS e concentração de suspensão respectivamente, foram significativos em comparação com os contrastes calculados a partir dos efeitos principais 3 e 4. Além disso, os contrastes secundários não se mostraram significativos para esse planejamento, dando a informação de que a interação de dois fatores não tem influência sobre a resposta.

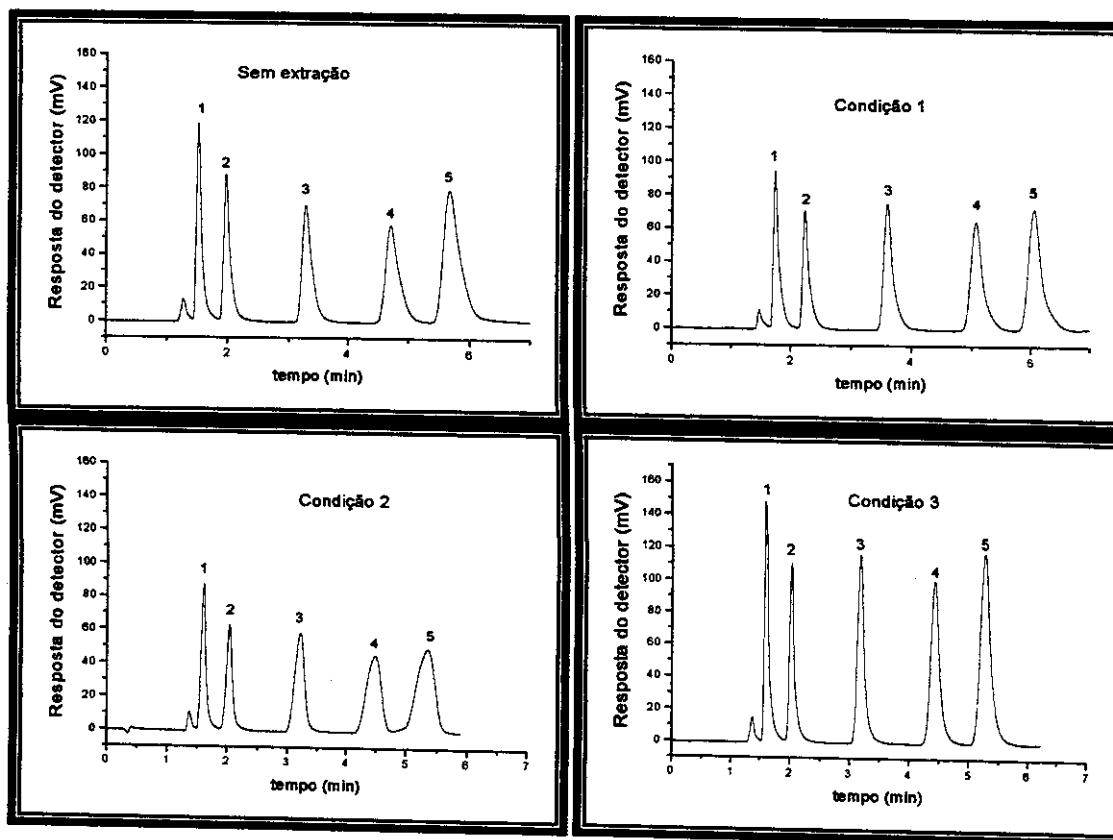


Figura 17- Cromatogramas de fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $5\mu\text{m}$, irradiadas por microondas à potência de 495 W, por 900 s e expostas a três condições de extração

Condição 1-Extração com hexano à uma vazão de $0,4\text{ mL min}^{-1}$;

Condição 2-Extração com hexano à uma vazão de $3,0\text{ mL min}^{-1}$;

Condição 3-Extração com clorofórmio e metanol à uma pressão de 34,5 MPa;

Condições cromatográficas: colunas $50\text{ mm} \times 3,9\text{ mm d.i.}$; vazão $0,3\text{ mL min}^{-1}$; FM Metanol:água 70:30 v/v; volume de injeção $5\mu\text{L}$ e detecção UV em 254 nm;

Mistura padrão: 1-acetona; 2-benzonitrila; 3-benzeno; 4-tolueno; 5-naftaleno.

Tabela 8. Resultados de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} aplicado a fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $5\mu\text{m}$, immobilizadas por à potência de 495 W, por 900 s

Ensaio	1	2	3	4	Resposta (N m^{-1})
1	-	-	-	-	74650
2	+	-	-	+	89350
3	-	+	-	+	56820
4	+	+	-	-	67120
5	-	-	+	+	69830
6	+	-	+	-	88680
7	-	+	+	-	23880
8	+	+	+	+	84230

Tabela 9. Efeitos dos fatores estudados para um fatorial completo 2^4 .

Efeitos	Valores
1	+13026
2	-11307
3	-2666
4	+5738
12=34	+4638
13=24	-6744
14=23	-1292
234	+13026
134	-11307
124	-2666
123	+5738

Abaixo são mostrados os valores de contrastes calculados a partir dos efeitos extraídos da tabela 9:

$$I_1 = \text{efeito 1} + \text{efeito 234} = +26052$$

$$I_{12} = I_{34} = \text{efeito 12} + \text{efeito 34} = +9276$$

$$I_2 = \text{efeito 2} + \text{efeito 134} = -22614$$

$$I_{13} = I_{24} = \text{efeito 13} + \text{efeito 24} = -13488$$

$$I_3 = \text{efeito 3} + \text{efeito 124} = -5332$$

$$I_{14} = I_{23} = \text{efeito 14} + \text{efeito 23} = -2584$$

$$I_4 = \text{efeito 4} + \text{efeito 123} = +11476$$

A figura 18 mostra dois cromatogramas extraídos do planejamento fatorial fracionário proposto, onde se constata que a carga de 40 % e a concentração de 10 % permitem obter colunas com altas eficiências e boas assimetrias. Além disso, usando concentrações de suspensão menores, ainda é possível obterem bons resultados. As caudas visualizadas no cromatograma referente ao ensaio 7 indicam que 30 % de PMOS propiciou um pequeno recobrimento do suporte cromatográfico, deixando os grupos silanóis expostos.

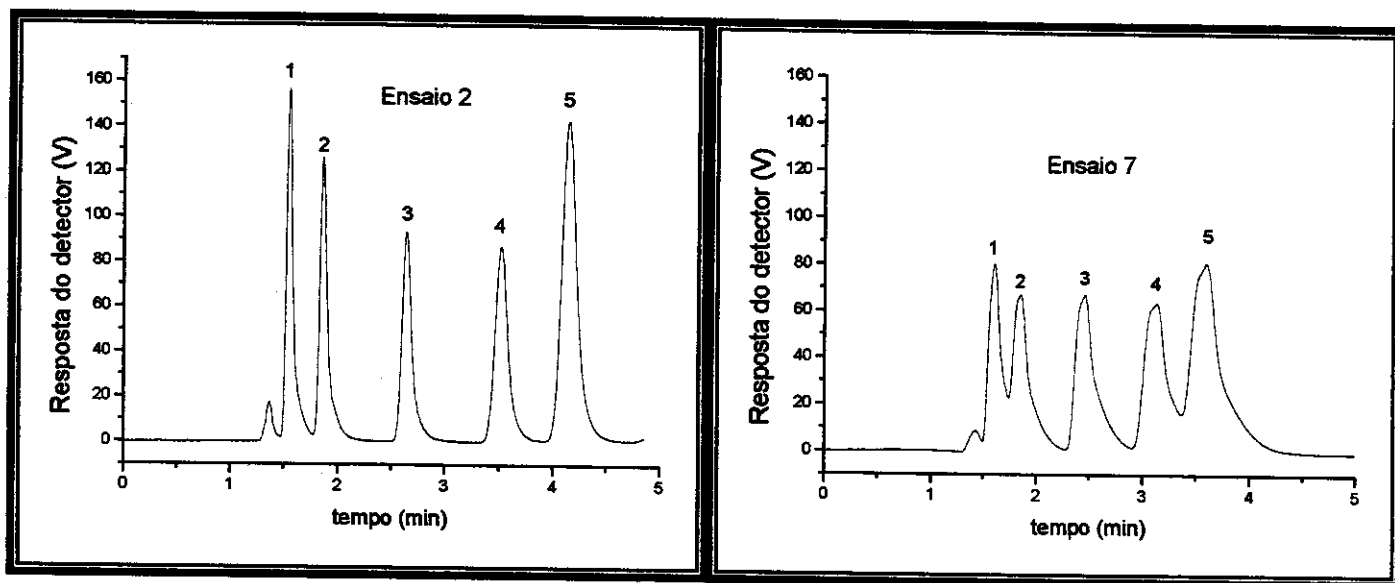


Figura 18- Cromatogramas de fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $5\mu\text{m}$, irradiadas por microondas à potência de 495 W, por 900 s obtidos através do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Ensaio 2- Carga de PMOS 40%, concentração de suspensão 10%, pressão de enchimento 34,5 MPa, tempo de agitação 16 horas;

Ensaio 7- Carga de PMOS 30%, concentração de suspensão 20%, pressão de enchimento 48,3 MPa, tempo de agitação 4 horas;

Condições cromatográficas: colunas 50 mm x 3,9 mm d.i.; vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; FM Metanol:água 70:30 v/v; volume de injeção $5 \mu\text{L}$ e detecção UV em 254 nm;

Mistura padrão: 1-acetona; 2-benzonitrila; 3-benzeno; 4-tolueno; 5-naftaleno.

4.5- Caracterização das fases estacionárias

4.5.1- Análise elementar de carbono

Os recheios das colunas foram submetidos a análise elementar de carbono antes e depois do enchimento, sendo que, os resultados mostrados nas tabelas 10 e 11, são as porcentagens de carbono finais presentes nas fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas. Nestas tabelas também estão os parâmetros cromatográficos obtidos com as fases estacionárias sorvidas e imobilizadas.

O acréscimo nos valores de %C obtido com o aumento do tempo de imobilização aliado à diminuição do fator de assimetria, é um indicativo de um recobrimento mais uniforme do suporte cromatográfico pelo PMOS causado pela radiação microondas. Além disso pode-se observar uma melhora significativa nos valores de eficiência com o pequeno acréscimo da quantidade do filme polimérico imobilizado sobre a sílica.

Tabela 10. Parâmetros cromatográficos e % de carbono das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas, preparadas a partir de sílica Davisil, 10 μm , e PMOS

t_i (s)	P (W)	N/m (m^{-1})	As*	k*	Rs**	%C
0	0	22.300	1.5	3.1	2.2	10.8
300	495	33.700	1.3	3.0	2.6	11.0
600	495	30.500	1.0	3.2	2.9	11.2
900	495	40.700	1.1	3.2	3.2	11.6

* calculado para o naftaleno, ** calculado para o par tolueno-naftaleno

Tabela 11. Parâmetros cromatográficos e % de carbono das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas, preparadas a partir de sílica Spherisorb, 5 μm , e PMOS

t_i (s)	P (W)	N/m (m^{-1})	A_s^*	k^*	R_s^{**}	%C
0	0	44.100	2.3	3.5	2.2	4.5
300	495	53.200	1.4	2.8	2.7	5.3
600	495	77.800	1.4	2.7	2.8	6.8
900	495	89.400	1.5	2.9	2.9	7.3

*calculado para o naftaleno, ** calculado para o par tolueno-naftaleno

4.5.2-Espectroscopia no infravermelho

Na figura 19 são mostrados os espectros de infravermelho das FE SiO_2 (PMOS) 10 μm , sorvidas e imobilizadas em microondas por 900 segundos à potência de 495 watts e extraídas com metanol a pressão de 34,5 MPa.

Através da análise dos espectros, podem ser observadas: uma banda larga na região de 3500 cm^{-1} (proveniente tanto das vibrações de grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água adsorvida fisicamente, como dos grupos hidroxila geminais), uma banda forte em torno de 1100 cm^{-1} (proveniente dos grupos siloxano da sílica e do PMOS). Além disso pode ser visualizado um ombro referente aos grupos silanol livre, em torno de 970 cm^{-1} a 980 cm^{-1} para os espectros referentes ao suporte cromatográfico e as fases extraídas a alta pressão. Para as fases que não foram extraídas, tanto as sorvidas como as imobilizadas, o ombro proveniente dos grupos silanol livre (970 cm^{-1}) praticamente deixou de existir. Esse comportamento é um indicativo de que, embora a radiação microondas, mantenha uma quantidade um pouco maior de polímero sobre o suporte cromatográfico para fases SiO_2 (PMOS), 10 μm , a extração provoca o lixiviamento da fase líquida e tem-se a presença de grupos silanóis residuais. Este lixiviamento é observado na figura 19, ao verificar a diminuição do triplete em $2.958,0$; $2.923,5$ e $2854,6 \text{ cm}^{-1}$, referente ao PMOS.

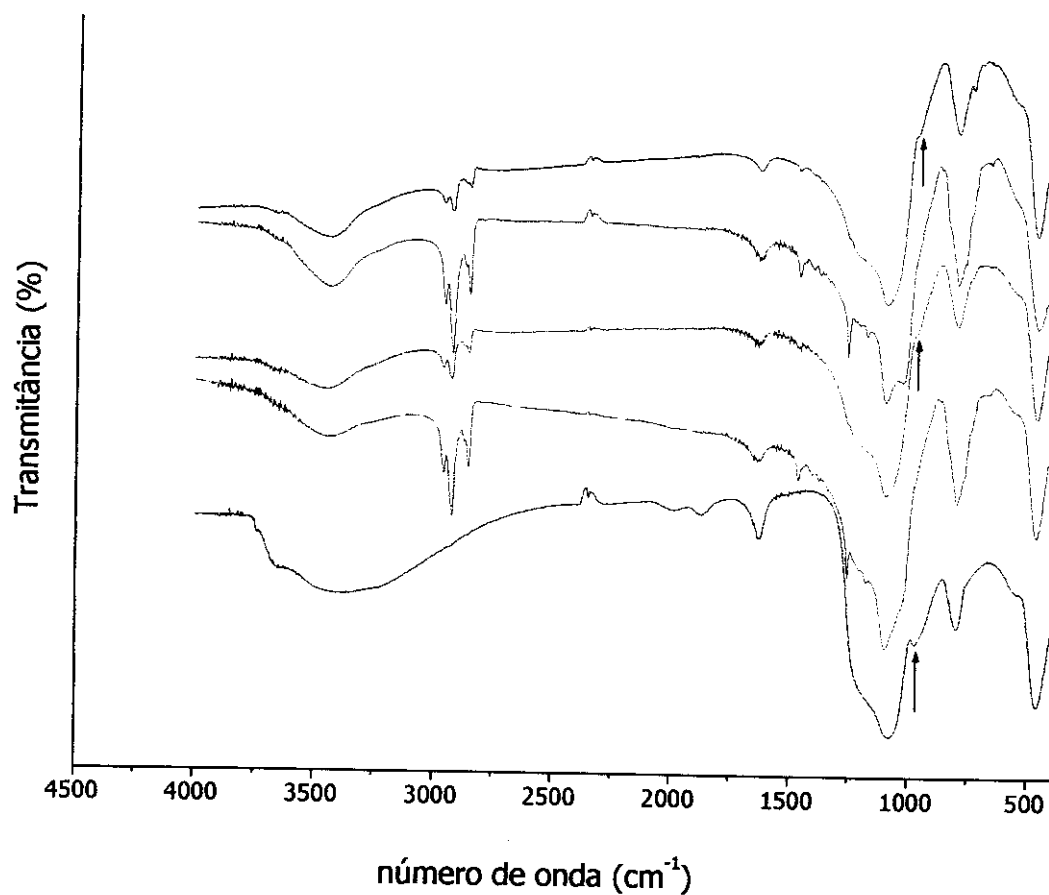


Figura 19- Espectros no Infravermelho de FE SiO₂(PMOS), 10 μm

- Sílica Davisil
- FE imobilizada e não extraída
- FE imobilizada e extraída com CHCl₃ e CH₃OH a 34,5 MPa
- FE não imobilizada e não extraída
- FE não imobilizada e extraída com CHCl₃ e CH₃OH a 34,5 MPa

Entretanto, para os espectros obtidos com as FE SiO₂ (PMOS), 5 μm, figura 20, é observada a presença do ombro referente aos grupos silanol livre somente no espectro referente ao suporte. Isso mostra que ocorreu um melhor recobrimento do suporte através da imobilização do PMOS sobre a sílica de 5 μm, haja visto que, os resultados de análise de carbono, tabela 11, mostram que a imobilização por microondas faz com que uma maior quantidade de polímero fique retida sobre o suporte. Embora haja um lixiviamento da fase estacionária líquida com a extração, observada nos espectros IV através da diminuição da intensidade do triplete na região de 3.000 cm⁻¹, relativo ao estiramento dos grupos metila do PMOS, verifica-se que uma distribuição mais homogênea do polímero sobre o suporte deve estar ocorrendo, uma vez que não se observa o ombro atribuído aos grupos silanóis, após as extrações.

4.5.3-Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (²⁹Si)

Na figura 21 são mostrados os espectros de RMN ²⁹Si das FE sorvidas e imobilizadas por microondas. Em ambos espectros, podem ser observadas ressonâncias dominantes em -110 (pico 1), -100 (pico 2) e -90 (pico 3) ppm atribuídas aos grupos siloxano (≡SiO)₄Si, silanol livre (≡SiO)₃Si*OH e silanol geminal (≡SiO)₂Si*(OH)₂⁵³ respectivamente. Além disso pode-se observar ressonâncias em -15 ppm referente a ligação da sílica com o PMOS (pico 4) e em -20 ppm atribuído ao PMOS (pico 5). Porém esse comportamento somente foi observado para o material imobilizado por microondas e não extraído, sendo que para as FE irradiadas e extraídas com metanol a 34,5 MPa, somente a ressonância do PMOS (pico 5) permanece intacta. Isso mostra que a imobilização por microondas não se apresentou muito efetiva na formação de uma ligação, mais estável, entre o suporte cromatográfico (sílica) e a fase líquida (PMOS).

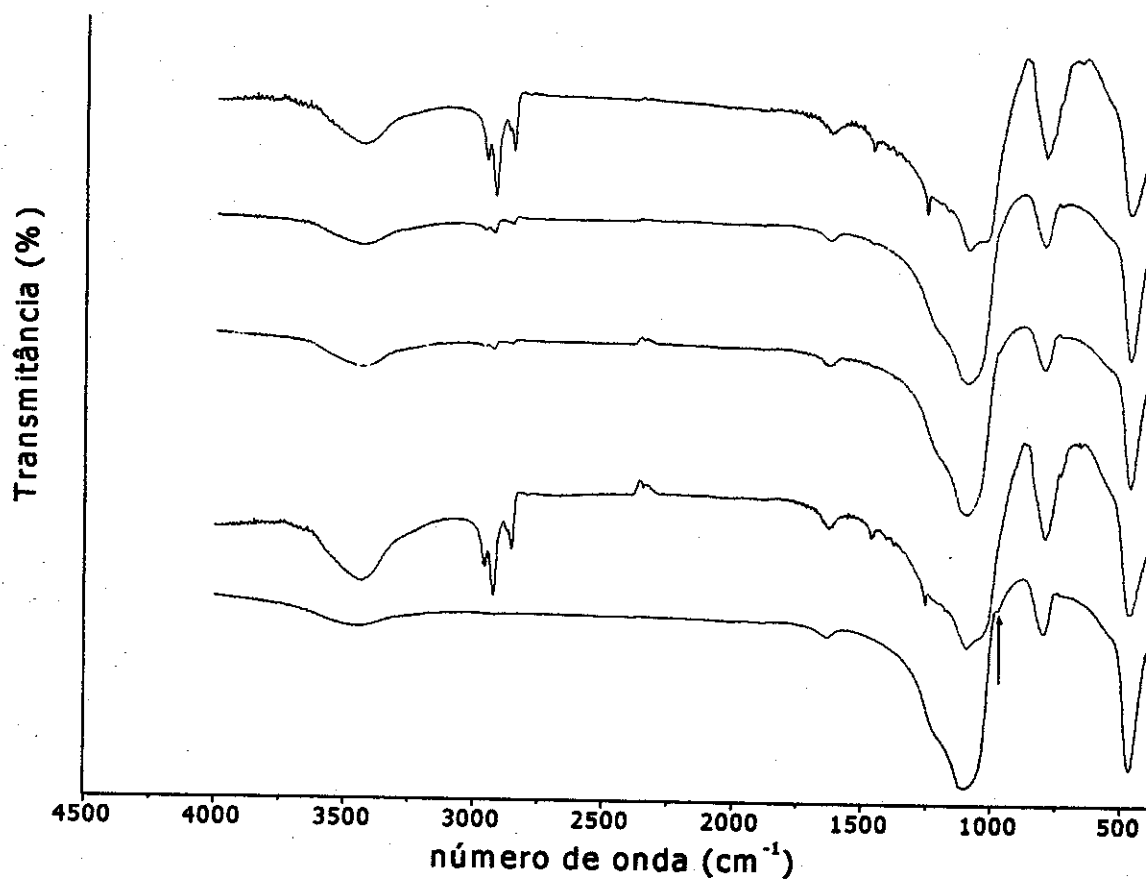


Figura 20- Espectros no Infravermelho de FE SiO₂(PMOS), 5 μm

- Sílca Spherisorb
- FE immobilizada e não extraída
- FE immobilizada e extraída com CHCl₃ e CH₃OH a 34,5 MPa
- FE não immobilizada e extraída com CHCl₃ e CH₃OH a 34,5 MPa
- FE não immobilizada e não extraída

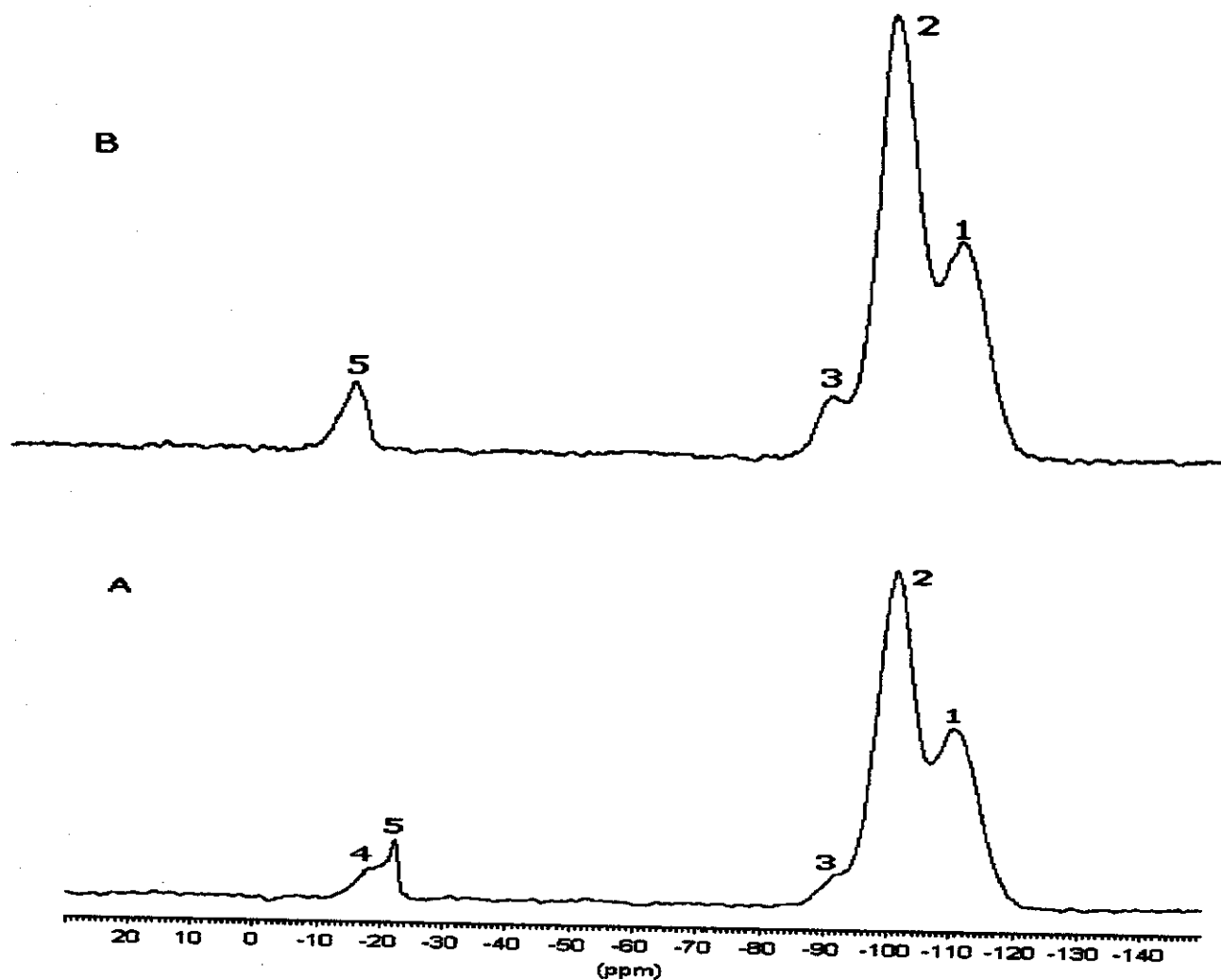


Figura 21- Espectros de RMN ^{29}Si das FE sorvidas e imobilizadas por microondas

A- FE imobilizada por microondas à P=495 W, por 900 s, sem extração;

B- FE imobilizada por microondas à P=495 W, por 900 s e extraída com Metanol a 34,5 MPa.

4.5.4-Microscopia eletrônica de varredura

Na figura 22 estão as fotomicrografias para a sílica Spherisorb 5 μm (A); FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, 5 μm (B) e FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, 5 μm , imobilizada e extraída (C).

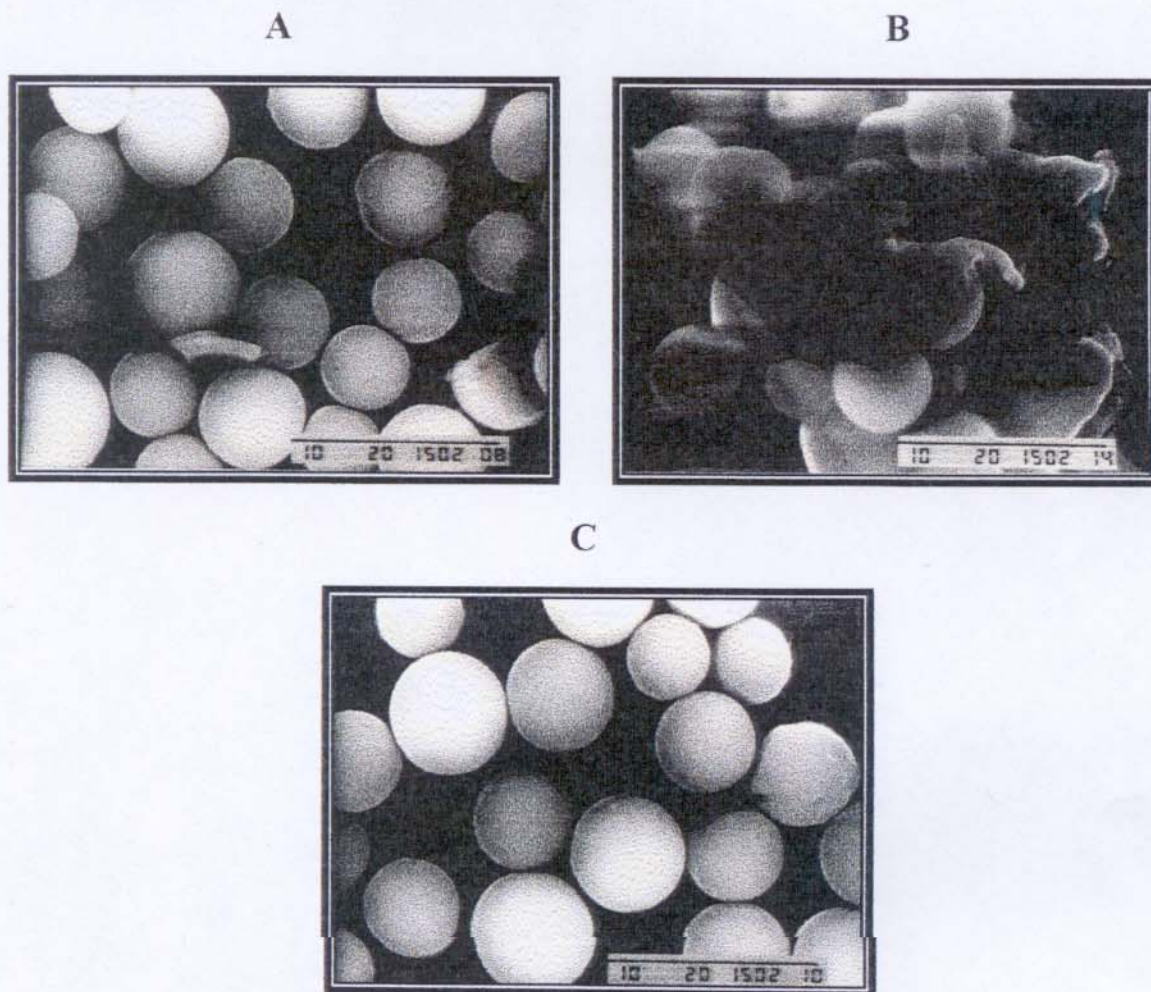


Figura 22- Microscopias eletrônicas de varredura

A) sílica Spherisorb 5 μm ;

B) FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, 5 μm , imobilizada por 900 s à potência de 495 W;

C) FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, 5 μm , imobilizada e extraída com Metanol/clorofórmio (100mL) (70:30 v/v) à pressão de 48,5 MPa.

Analisando a figura 22, observa-se que o suporte é constituído de partículas esféricas com um intervalo de distribuição de tamanho bastante regular e que o

excesso de PMOS sorvido sobre partículas de sílica de 5 μ m, figura 22 (B), comprometeu a obtenção de uma fotografia com melhor resolução, devido a pouca estabilidade da fase ao ser atingida pelo feixe de elétrons do microscópio. Na figura 22 (C) observa-se que a extração elimina o excesso de polímero existente na FE.

4.6-Estabilidade química das FE

A estabilidade química das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas por microondas e das FE comerciais (Rainin C-8), 5 μ m, foi verificada usando FM neutra, seguindo uma nova metodologia desenvolvida no nosso laboratório de pesquisas^{50,51}.

Os gráficos da figura 23 mostram as variações nos valores de eficiência, fator de assimetria e fator de retenção obtidas com as fases imobilizada e a comercial. Analisando os resultados, pode-se observar que a fase comercial testada apresentou valores de eficiência e fator de assimetria constantes após a passagem de 3.750 mL de FM. Para as FE imobilizadas por microondas, observou-se uma perda de 50 % de eficiência após a passagem de cerca de 2600 mL de FM, atingindo um novo patamar até a passagem de 3500 mL de FM, enquanto os valores de fator de assimetria mantiveram-se praticamente constantes durante todo o experimento de estabilidade. Os fatores de retenção, calculados para o naftaleno, sofreram pequenas alterações, entretanto, para ambas as fases, permaneceram dentro do intervalo aceito na literatura.

A fase estacionária imobilizada por microondas possui uma menor estabilidade que as disponíveis comercialmente e isto requer estudos futuros, entretanto mesmo perdendo cerca de 50% de eficiência, os fatores de assimetria e retenção sofreram variações, que ainda permitem que a coluna continue sendo utilizada.

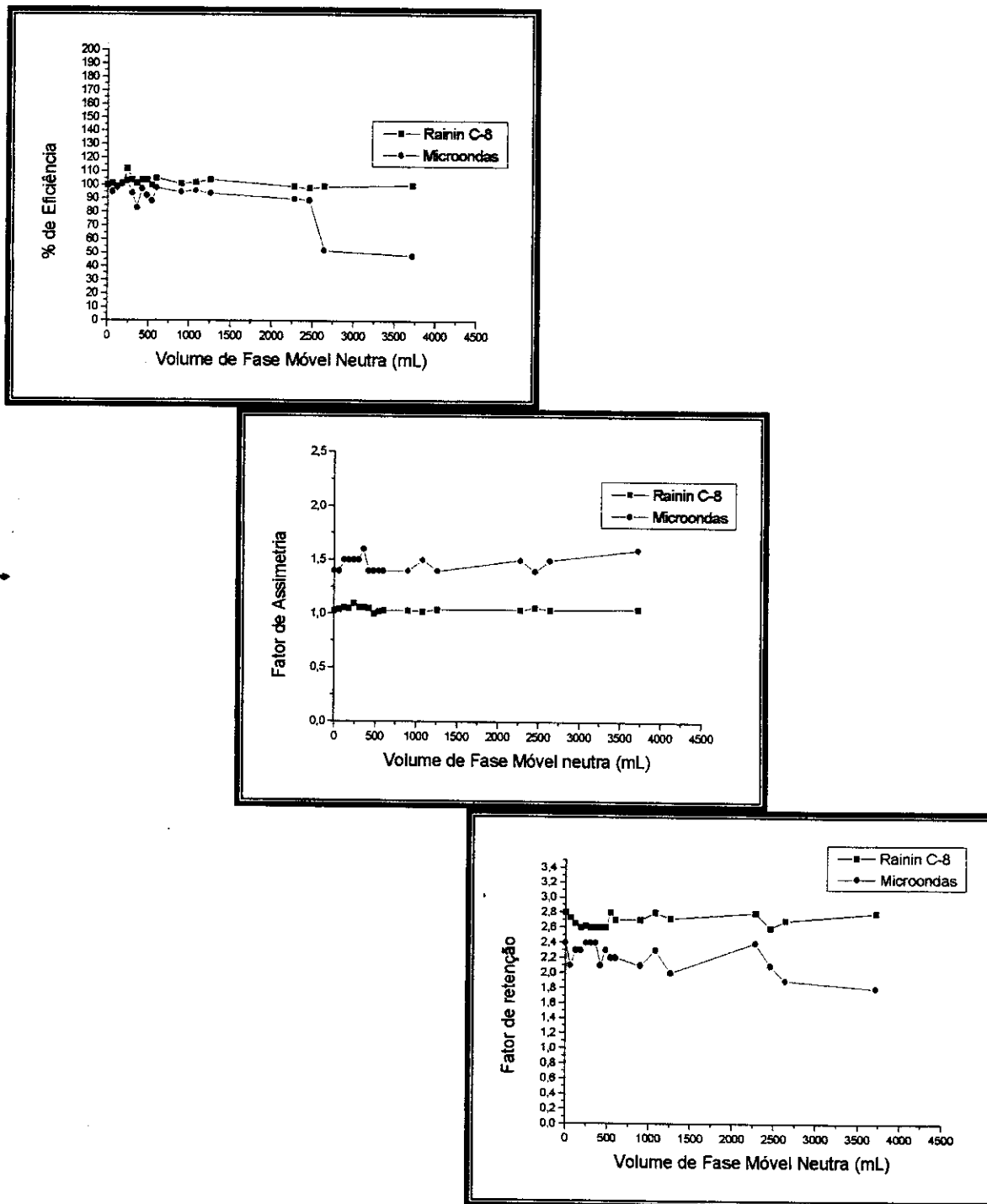


Figura 23- Comparação de estabilidade química Rainin C-8 e imobilizadas por microondas

Condições do teste: FM neutra Metanol:H₂O (50:50 v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹;
Condição de análise: FM Metanol:H₂O (70:30 v/v), vazão 0,3 mL min⁻¹.

4.7-Aplicação das colunas recheadas com fases estacionárias imobilizadas por microondas em análises de pesticidas

A potencialidade das FE imobilizadas por microondas foi avaliada através da análise de multirresíduo de pesticidas e na análise de urina fortificada com diuron e linuron.

A figura 24 mostra os cromatogramas obtidos na separação de uma amostra contendo seis pesticidas padrão, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron, ametrina e benomil, usando a FE $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 5 μm , imobilizada por microondas e uma coluna recheada com FE comercial, Rainin C-8, 5 μm , nas mesmas condições de análise.

Analisando a figura 24 verifica-se que o benomil, sendo um composto bastante polar, praticamente elui junto com a FM na coluna recheada com fase imobilizada por microondas, não sendo detectado, e na coluna comercial encontra-se apenas parcialmente separado do tebutiuron. Os demais pesticidas tiveram separações muito boas em ambas as colunas destacando-se o tempo relativamente curto de análise (~ 13 minutos obtido com a coluna imobilizada por microondas, contra os ~ 30 minutos da coluna comercial) contribuindo para a redução de custos e de resíduos. Acredita-se que com um estudo mais profundo da FM consiga-se obter uma boa separação de todos herbicidas.

Os resultados de recuperação dos herbicidas diuron e linuron em três níveis de fortificação de amostras de urina, são mostrados na tabela 12 e 13 para o diuron e linuron, respectivamente.

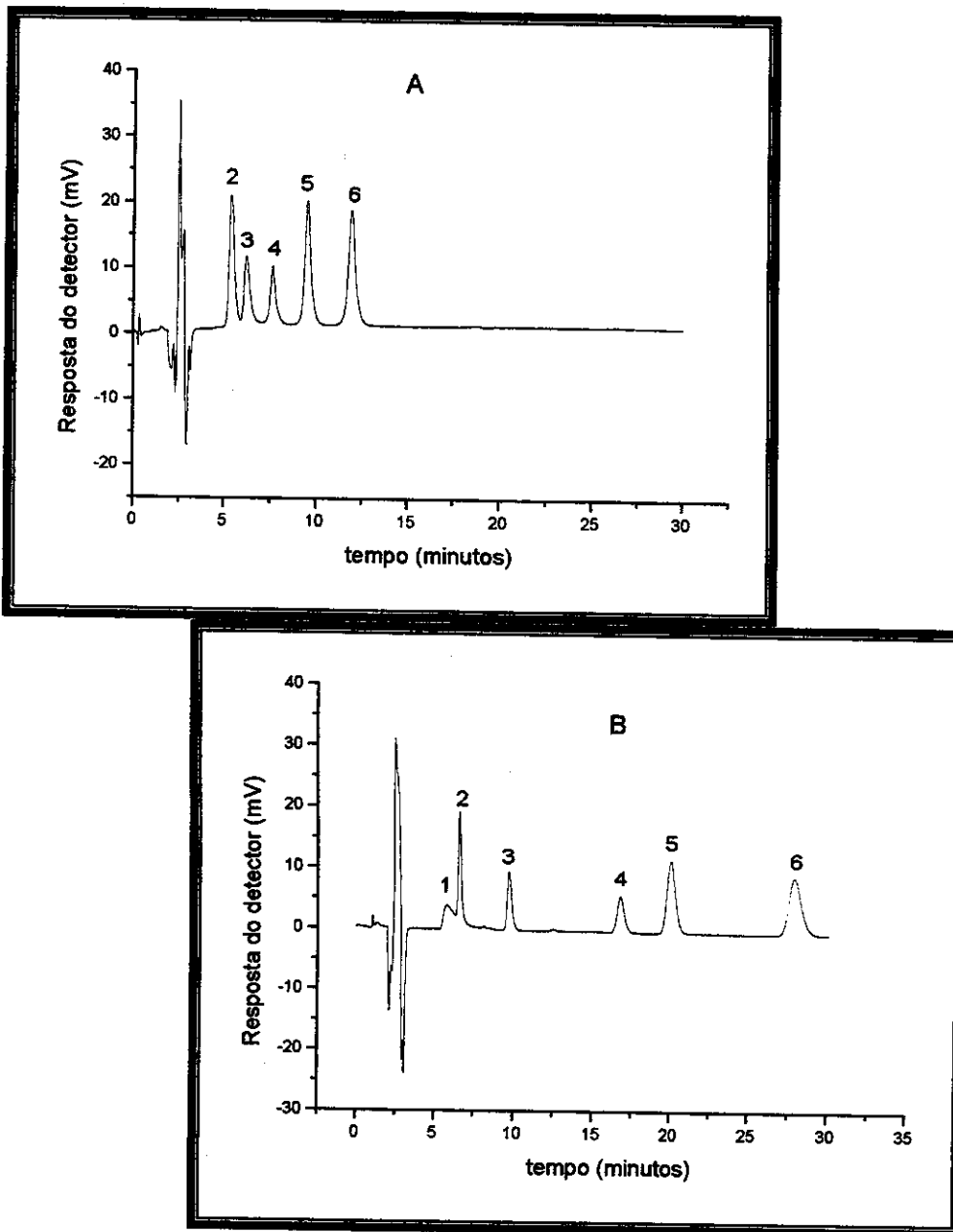


Figura 24- Cromatogramas obtidos na análise de multirresíduo de pesticidas utilizando dois diferentes tipos de FE.

A- FE SiO_2 (PMOS), $5\mu\text{m}$, imobilizada por microondas;

B- FE Rainin C-8, $5\mu\text{m}$;

Condições cromatográficas: colunas 150 mm x 3,9 mm d.i., vazão $0,5\text{ mL min}^{-1}$; FM acetonitrila:água 35:65 v/v; volume de injeção $10\mu\text{L}$ e detecção UV em 235 nm.

Mistura: 1-benomil; 2-tebutiuron; 3-simazina; 4-atrazina; 5-diuron; 6-ametrina.

Tabela 12. Recuperações do diuron após extração e análise em coluna recheada com FE SiO₂(PMOS), 5 μm, irradiada por microondas

Fortificação (μg L ⁻¹)	Recuperação (%) média	Precisão (CV) % n=3
40	95	1,8
80	99	0,4
160	103	1,4

Condições cromatográficas: colunas 150mm x 3,9mm d.i., vazão 0,8 mL min⁻¹; FM acetonitrila:água 40:60 (v/v); volume de injeção 10 μL e detecção UV em 235 nm.

Tabela 13. Recuperações do herbicida linuron após extração e análise em coluna recheada FE imobilizada por microondas

Fortificação (μg L ⁻¹)	Recuperação (%) média	Precisão (CV) % n=3
60	85	1,5
120	98	0,8
240	100	0,4

Condições cromatográficas: colunas 150mm x 3,9mm d.i., vazão 0,8 mL min⁻¹; FM acetonitrila:água 40:60 (v/v); volume de injeção 10 μL e detecção UV em 235 nm.

Nas figuras 25 e 26 estão representadas as curvas analíticas obtidas para o diuron e linuron e na tabela 14 estão os resultados de alguns parâmetros de validação do método de análise dos herbicidas em urina, após extração em fase sólida, com tubo contendo FE SiO₂(PMOS), 40 μm, confeccionado no laboratório e análise por CLAE empregando a coluna recheada com FE SiO₂(PMOS), 5 μm, imobilizada por microondas à potência de 495 watts, por 900 segundos.

Tabela 14. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de herbicidas em urina

herbicidas	Curva analítica (área x conc)			LOQ (μg L ⁻¹)	R (%)
	a	b	r		
linuron	323,3	52,26	0,99993	20	85
diuron	47,50	45,39	0,99995	10	95

a= coeficiente angular

b=coeficiente linear

r=coeficiente de correlação

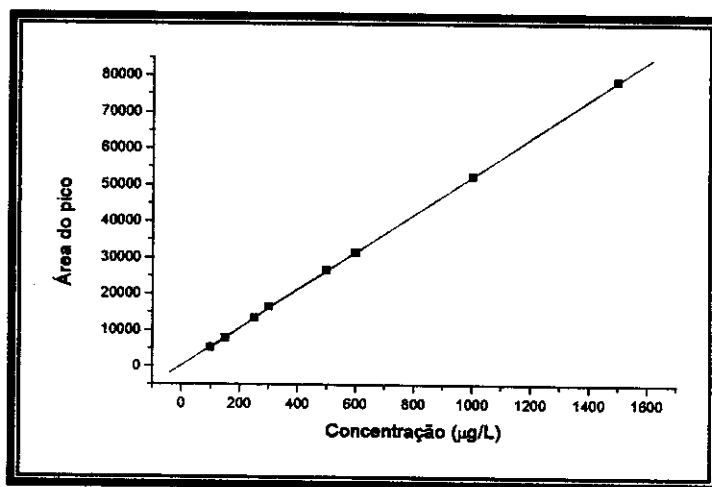


Figura 25- Curva analítica para o herbicida diuron obtida com a coluna recheada com FE imobilizada por microondas

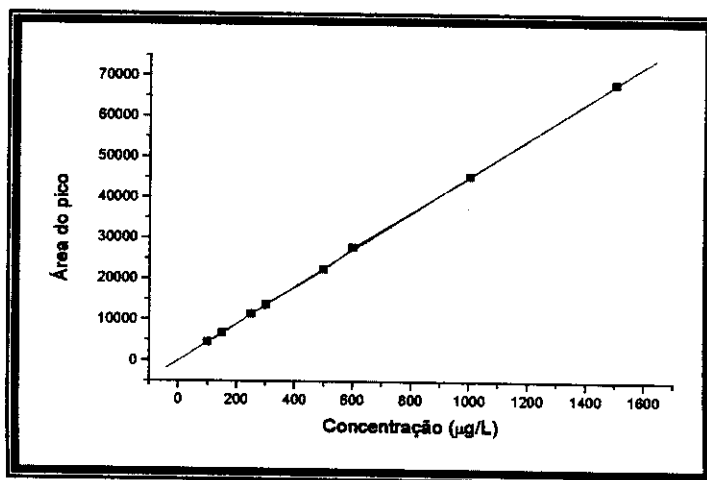


Figura 26- Curva analítica para o herbicida linuron obtido com coluna recheada com FE imobilizada por microondas

Analisando a tabela 14 e as figuras 25 e 26 nota-se que as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação maiores que 0,9999

e com intervalo de linearidade de 40-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron e de 60 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o linuron.

As recuperações obtidas nos três níveis de fortificação foram muito boas, pois estão compreendidas no intervalo aceito na literatura que é de 50-120 %⁵².

Os limites de quantificação (LOQ) encontrados foram satisfatórios permitindo que se faça o monitoramento da urina de pacientes expostos a contaminação com diuron e linuron.

As duas aplicações realizadas mostraram que as FE SiO_2 (PMOS), preparadas a partir de imobilização por microondas são potencialmente úteis para serem empregadas em análises de pesticidas presentes tanto em água como em amostras biológicas, como urina.

5. Conclusões

As fases estacionárias sorvidas, de 10 μm e 5 μm , são viáveis de serem utilizadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, entretanto a imobilização traz benefícios às fases estacionárias tanto em ganho de eficiência como estabilidade química.

As melhores condições a serem empregadas na imobilização de fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 10 μm , por microondas são: irradiação a seco da FE sorvida, tempo de irradiação de 900 segundos, potência de 495 watts e a não ativação da sílica.

Essas condições também foram utilizadas para as fases estacionárias preparadas a partir de partículas de sílica de 5 μm com PMOS sorvido e imobilizado sobre sílica. Porém para estas fases foi necessário extrair o excesso de PMOS imobilizado sobre o suporte, pois os resultados obtidos com as fases não extraídas não foram satisfatórios. Dessa forma as fases imobilizadas passaram a ser extraídas com clorofórmio e metanol à pressão de 34,5 MPa (5000 psi).

Através dos resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} proposto foi possível notar que os fatores 1 e 2 carga de PMOS e concentração de suspensão respectivamente, foram bastante significativos em relação aos demais fatores estudados, pressão e tempo de agitação da suspensão de enchimento. Dessa forma adotou-se no preparo de fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 5 μm , uma carga de 40 %, concentração de suspensão em clorofórmio de 10 %, agitação por 16 horas e enchimento das colunas à uma pressão de 5000 psi (34,5 MPa).

A partir dos resultados obtidos com a imobilização por microondas pode-se concluir que esse tipo de irradiação é uma maneira bastante simples e eficaz de promover um recobrimento mais uniforme do suporte e uma maior eficiência da fase estacionária, uma vez que para sílica de 10 μm conseguiu-se uma eficiência de 40.700 pratos m^{-1} e assimetria de 1,1 e para sílica de 5 μm a eficiência foi de ~ 89.000 e o fator de assimetria de 1,5.

As porcentagens de carbono obtidas através de análise elementar, mostraram que a imobilização por microondas retém uma maior quantidade de polímero permitindo um melhor recobrimento da sílica. Os espectros de

infravermelho mostraram que o recobrimento dos grupos silanol livre é mais efetivo para as fases estacionárias preparadas a partir de partículas de sílica de 5 μm de tamanho, onde se observa a presença desses grupos, a 970 cm^{-1} , somente para a sílica nua.

A partir do teste de estabilidade proposto foi possível concluir que, mesmo apresentando uma estabilidade química satisfatória com fase móvel neutra, as fases estacionárias imobilizadas por microondas necessitam de novos estudos para que a sua estabilidade possa tornar comparada às das fases estacionárias comerciais. Esta estabilidade reduzida das fases estacionárias imobilizadas por microondas, possivelmente, possa ser atribuída a não ligação do PMOS ao suporte, confirmada pelos estudos de ressonância magnética nuclear do ^{29}Si .

As fases imobilizadas por microondas possuem potencialidade para serem utilizadas em análises de pesticidas presentes tanto em água como em urina.

A principal vantagem da utilização das microondas é a alta velocidade de aquecimento, comparada a imobilização térmica realizada através de aquecimento em estufa. Além da rapidez no preparo das FE imobilizadas por microondas, a facilidade e a disponibilidade do equipamento, os custos e cuidados na utilização desse método são bastante reduzidos se comparados com a radiação gama e outros métodos de imobilização, tornando mais viável a preparação de fases pelos usuários da cromatografia.

6. Referências Bibliográficas

1-Majors, R.E., "Trends in HPLC Column Usage", LC-GC, 6 (1998) 298.

2- Anazawa, T.A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1992.

3-Roth, M.; Novák, J.; David, P.; Novotny, M., "Thermodynamic Studies Into a Sorption Mechanism Within the Cross-Linked Polysiloxane Stationary Phases", Anal. Chem., 59 (1987) 1490.

4-Hetem, M.J.J.; Haan, J.W. de ; Classens, H.A.; Cramers, C.A., "Characterization and Stability of Silanized and Polymer-Coated Octadecyl Reversed Phase", J.Chromatogr., 540 (1991) 53.

5-Haky, J.E.; Vemulapalli, S.; Wieserman, L.F, "Comparison of Octadecyl-Bonded Alumina and Silica of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", J. Chromatogr., 505 (1990) 307.

6-Berek, D.; Novák, I., "Silica Gel and Carbon Column Packings for use in High Performance Liquid Chromatography", Chromatographia, 30 (1990) 582.

7-Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", J. Chromatogr., 1 (1991) 549.

8-Poole, C.F.; Schuette, S.A., Contemporary Practice of Chromatography, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1984.

9-Engelhardt, H.; Ahr, G., "Properties of Chemically Bonded Phases", Chromatographia, 14 (1981) 227.

10-Engelhardt, H.; Deyer, B.; Schmidt, H., "Properties and Diversity of C18 Bonded Phases", *Chromatographia*, 16 (1982) 11.

11-Kirkland, J.J.; Glajch, J.L.; Farlee, R.D., "Synthesis and Characterization of Highly Stable Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography Columns Packings". *Anal.Chem.*, 61 (1989) 2.

12-Glajch, J.L.; Kirkland, J.J., "Sterically Protected, Mono-Functional-Silane Bonded-Phase Columns for High Performance Liquid Chromatography", *LC-GC*, 8 (1990) 140.

13- Scholten, A.B.; de Haan, J.W.; Claessens, H.A.; van de Ven, L.J.M.; Cramers, C.A., "²⁹Silicon NMR Evidence for the Improved Chromatographic Siloxane Bond Stability of Bulky Alkylsilane Ligands on a Silica Surface", *J.Chromatogr. A.*, 688 (1994) 25.

14-Houbenova, A.; Claessens, H.A.; de Haan, J.W.; Cramers, C.A.; Stluik, K., "An Investigation Concerning the Stability of Sterically Protected Cyanopropyl Modified Silica Substrate", *J.Liq.Chromatogr.*, 17 (1994) 49.

15-Sagliano, N.; Floyd, J.R.; Hortwick, R.A., "Studies on the Stabilization of Reversed Phases for Liquid Chromatography", *J.Chromatogr.*, 443 (1988) 155.

16-Engelhardt, H.; Löw, H.; Eberhardt, W.; Mauß, M., "Polymer Encapsulated Stationary Phases: Advantages, properties and Selectivities" *Chromatographia*, 27 (1989) 535.

17-Wirth, M.J.; Fatumbi, H.O., "Horizontal Polymerization of Mixed Trifunctional Silanes on Silica. 2 Application to Chromatographic Silica Gel", *Anal.Chem.*, 65 (1993) 822.

18-Fairbank, R.W.P.; Wirth, M.J., "Role of Surface-Adsorbed Water in the Horizontal Polymerization of Trichlorosilanes", *J.Chromatogr. A*, 830 (1999) 285.

19-Akapo, S.O.; Fatumbi, H.O., "The Performance of Mixed Horizontally Polymerization Phases versus Conventional C18 Silica Columns For Reversed-Phases HPLC", *LC-GC*, 17 (1995) 334.

20-Li, L.; Carr, P.W.; Evans, J.F., "Studies of Retention and Stability of Horizontally Polimerized Bonded Phase for Reversed Phase Liquid Chromatography", *J.Chromatgr. A*, 868 (2000) 153.

21-Pesek, J.J.; Mayska, M.T.; Ramakrishnan, J., "Synthesis and Characterization of Titania Based Stationary Phases Using the Silanization/Hydrosilation Method", *Chromatographia*, 44 (1997) 538.

22-Zuo, Y.M.; Zhu, B.R.; Liao, Y.; Gin, M.D.; Pang, Z.L.; Qi, J.X., "Polymer Encapsulated Packing Materials for Reversed Phase Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 38 (1994) 756.

23-Bien-Volgelsang, U.; Deege, A.; Figge, H.; Köhler, J.; Schomburg, G., "Synthesis of Stationary Phases for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating", *Chromatographia*, 19 (1984) 170.

24-Figge, H.; Geege, A.; Köhler, J.; Schomburg, G., "Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. Coating of Silica by Polymers of Various Polarities", *J.Chromatogr.* 351 (1986) 393.

25-Crini, G.; Morcellet, M., "HPLC of Structural Isomers with Cyclodextrin-poly(vinylamine)Coated Silica Columns, Part I: Synthesis and Characterization of

Cyclodextrin-Bonded Stationary Phases by NMR Solid State", *J.Chromatogr. Sci.*, 34 (1996) 477.

26-Crini, G.; Morcellet, M., "HPLC of Structural Isomers with Cyclodextrin-poly(vinylamine)Coated Silica Columns, Part II: Retention Behaviour and Separation", *J.Chromatogr. Sci.*, 34 (1996) 485.

27-Crini, G.; Lekchiri, Y.; Janus, L.; Morcellet, M.; Morin, N., "Beta-Cyclodextrin-Copolymers Coated on Silica Beads: Synthesis, Characterization and Retention Behaviour in HPLC", *Chromatographia*, 50 (1999) 661.

28-O`Gara, J.E.; Alsen, B.A.; Petersen, J.S.; Niederland, C.L.; Neue, U.D., "Simple Preparation of C8 HPLC Stationary Phase With Internal Polar Functional Groups", *Anal.Chem.*, 67 (1995) 3809.

30-Heinemann, G.; Köhler, J.; Schomburg, G., "New Polymer Coated Anion-Exchange HPLC-Phases. Immobilization of Poly(2-hidroxy,3N-ethylenediamin)butadiene on Silica and Alumina", *Chromatographia*, 23 (1987) 435.

31-da Silva, M.C.H.; Jardim, I.C.S.F., "Preparation Of A C18 Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation For Use in High Performance Liquid Chromatography", *J.Liq.Chromatogr. Relat. Technol.*, 21 (1998) 2447.

32-Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z., "Polymer Coated Stationary Phases For Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 28 (1989) 19.

33-Schomburg, G.; Decke, A.; Köhler, J.; Bien-Volgelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids in Reversed and Normal Phase Chromatography. Production and

Testing of Materials for Bonded-Phase Chromatography", *J.Chromatogr.*, 282 (1983).

34- Schomburg, G.; Köhler, J.; Fiegge, H.; Deege, A.; Bien-Volgelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation", *Chromatographia*, 18 (1984) 265.

35-Ohtsu, Y.; Shiojuna, Y.; Okumura, T.; Koyama, J.-I.; Nakamura, K.; Nakata, O.; Kimata, K.; Tanaka, N., "Performance of Polymer-Coated Silica C18 Packing Materials Prepared From High Purity Silica Gel. Suppression of Undesirable Secondary Retention Processes", *J.Chromatogr.*, 481 (1989)147.

36-Jardim, I.C.S.F.; Collins, K.E.; Anazawa, T.A., "Radiation Immobilization Of Poly(methyloctylsiloxane) On Silica For Use In HPLC: a Uniform Layer Model", *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 299.

37-Basso, M.A., "Avaliação da Radiação Gama como Agente de Imobilização de Algumas Fases Estacionárias Sobre Suportes Para Uso em Cromatografia Gasosa", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1989.

38-Kingston, H.M.; Jessie, L.B., *Introduction to Microwave Sample Preparation*, ACS Professional Reference Book, 263, 1998.

39- Homepage da CEM corporation (www.cem.com).

40- Cresswell, S.L.; Haswell, S.J., "Microwave Ovens-Out Of The Kitchen", *J.Chem Ed.*, 78 (2001) 900.

41-Zlotorzynski, A., "The Application of Microwave Radiation to Analytical And Environmental Chemistry", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25 (1995) 43.

42-Snyder, I.R.; Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª edição, John Wiley and Sons, New York, 1979.

43-Braithwaite, A.; Smith, F.J., *Chromatographic Methods*, 4ª edição, Chapman and Hall, London, 1985.

44-Cabrera, K.; Arras, R.; Lubda, D.; Krebs, K.F.; Wieland, G.F., "Preparation and Chromatographic Characterization Of A New Stationary Phase for Reversed-Phase HPLC Based On A High-Purity Silica", *Am. Lab.*, 29(4) (1997) 44.

45-Melo, L.F.C., "Desenvolvimento de Fases Estacionárias C-8 Sorvidas e Imobilizadas para CLAE a partir de Sílica Zirconizada", *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

46-Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S., *Statistics for Experimenters. An Introduction To Design, Data Analysis And Model Buildings*, New York, 1978.

47-Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., *Planejamento E Otimização De Experimentos*, Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 1995.

48-Collins, K.E.; Franchon, A.C.; Jardim, I.C.S.F.; Radovanovic, E.; Gonçalves, M.C., "The Effects Of Inner Surface Roughness Of Microbore Column Blanks On Column Performance", *LC-GC*, 18 (2000) 106.

49-Collins, K.E.; Bottoli, C.B.G.; Bachmann, S.; Vigna, C.R.M.; Collins, C.H.; Albert, K., "Self-Immobilization Of Poly(methyloctylsiloxane) on HPLC Silica", *Chem. Mater.* aceito para publicação.

50-Fonseca, D.A, "Desenvolvimento De Um Novo Procedimento De Avaliação Da Estabilidade De Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P, 2001.

51-Tonhi, E.; Collins, K.E.; Collins, C.H., "Avaliação da estabilidade de Fases Estacionárias Para CLAE Baseadas em PMOS Imobilizado Sobre Sílica", apresentado no 11º Encontro Nacional de Química Analítica, realizado na UNICAMP de 18 a 21 de Setembro de 2001.

52-"Roteiro para Validação de Metodologia Analítica Visando a Determinação de Resíduos de Pesticidas" Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura, GARP, 1999.