



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica

Dissertação de Mestrado

***“Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias
para CLAE de Poli(metilfenilsiloxano) sobre Sílica Sorvida
e Imobilizada por Radiação Microonda”***

Lívia Maria Andrekowisk Fioravanti
Autora

Prof^a Dr^a Isabel C. S. F. Jardim
Orientadora

Campinas/SP
-2007-

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE QUÍMICA DA UNICAMP**

F511p Fioravanti, Livia Maria Andrekowisk.
Preparação e caracterização de fases
estacionárias para CLAE de poli(metilfenilsiloxino)
sobre sílica sorvida e imobilizada por radiação
microonda / Livia Maria Andrekowisk Fioravanti. --
Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
2. Fases estacionárias. 3. Radiação microonda.
4. Poli(metilfenilsiloxano). I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation and characterization of sorbed and microwave immobilized HPLC stationary phases of poly (methylphenylsiloxane) on silica

Palavras-chaves em inglês: HPLC, Stationary phases, Microwave immobilization, Poly (methylphenylsiloxane)

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Susane Rath (IQ-UNICAMP), Tânia Akiko Anazawa (UNIP-Sorocaba)

Data de defesa: 28/11/2007

Aos meus pais, Sílvia e Atilio,
obrigada por me darem o meu maior tesouro,
minha educação.

Às minhas irmãs, Carolina e Isabel,
pelo companheirismo e grande amizade.

Dedico esta Dissertação.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a Dr^a Isabel Jardim, pela excelente orientação, confiança, paciência e pelo exemplo de profissional e mulher.
- Aos professores Carol e Kenneth Collins pelas discussões, apoios e orientações sempre importantes a todo o grupo do LabCrom.
- Aos professores Solange Cadore e Marco Aurélio Zezzi de Arruda pela liberação do forno microonda para a imobilização das fases estacionárias.
- Aos colegas de trabalho Anízio, Laís, Thaís e César pelo grande apoio e imensa ajuda no meu trabalho.
- Aos amigos e colegas do LabCrom, Camila, Carla, Cíntia, Christian, Daniel, Dione, Elias, Josimara, Juliano, Liane, Louise, Lúcia, Marcel, Márcia, Mariza, Milena, Patrícia, Priscila, Roberta, Rose, Vanessa e Wilker, pela agradável convivência no laboratório e inúmeras discussões sobre nossos trabalhos.
- Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP que muito me ajudaram na conclusão desta dissertação.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela oportunidade e estrutura disponível para realização do meu trabalho.
- Aos meus avós, tios(as) e primos(as), pela amizade e incentivo a minha carreira.
- Aos meus amigos de Faculdade e de Tambaú, pelo grande apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.
- Aos meus colegas de trabalho, Bruno, Denise, Emanuel, Gilson, Guilherme, João e Marcelo pela grande força que me deram na finalização desta dissertação.
- À FAPESP pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para participação nas reuniões científicas.
- À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Graduação em Química, Modalidade Bacharelado e Licenciatura

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001 a 2006

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Instituto Inovação, Campinas/SP

Analista Sênior (04/2007 – Atual)

- Agência de Inovação da Unicamp – INOVA, Campinas/SP

Bolsista do Programa de Investigação Tecnológica (02/2005 - 07/2005).

- Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas/SP

Estagiária do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais (08/2004 - 03/2005)

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- Monitora da Disciplina QA-582 (Química Analítica Instrumental I), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP (03/2006 – 07/2006)

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Uso da Voltametria em Sistemas Ternários Homogêneos de Solventes Para a Determinação de Cd (II), Pb (II), Zn (II) e Cu (II) em Amostras Agroambientais

Instituto de Química - Departamento de Química Analítica - UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. João Carlos de Andrade. Bolsa CNPq (08/2003 a 07/2004)

- Avaliação de Métodos para a Determinação de Cloreto, Bicarbonato e Nitrogênio Inorgânico em Extratos Aquosos de Substratos para Cultivo Protegido

Instituto de Química - Departamento de Química Analítica - UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. João Carlos de Andrade. Bolsa SAE (08/2002 a 07/2003).

CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS

- 30ª Reunião Anual da SBQ – Águas de Lindóia/SP, 2007

Título: Seleção das Condições de Imobilização, por Radiação Microonda, de Poli(metilfenilsiloxano) em Sílica Usando Planejamento Fatorial

Autores: Livia M. A. Fioravanti e Isabel C. S. F. Jardim

- II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, SIMCRO – São Pedro/SP, 2006.

Título: Preparo de Fases Estacionárias de Poli(metilfenilsiloxano) sobre Sílica Imobilizadas por Radiação Microonda

Autores: Livia M. A. Fioravanti e Isabel C. S. F. Jardim

- XII Congresso de Iniciação Científica, UNICAMP – Campinas/SP, 2004.

Título: Uso da Voltametria em Sistemas Ternários Homogêneos de Solventes para a Determinação de Cd (II), Pb (II), Zn (II) e Cu (II) em Amostras Agroambientais

Autores: Livia M. A. Fioravanti e João Carlos de Andrade

- XI Congresso de Iniciação Científica, UNICAMP – Campinas/SP, 2003.

Título: Avaliação do Método de Gran para a Determinação de Bicarbonato, Cloreto e Nitrogênio Inorgânico em Extratos Aquosos de Substratos

Autores: Livia M. A. Fioravanti e João Carlos de Andrade

- III ENSUB – Encontro Nacional de Substratos para Plantas, IAC - Campinas/SP, 2002.

Título: Comparação de Métodos para a Determinação de Bicarbonato em Extratos Aquosos de Substratos

Autores: Livia M. A. Fioravanti, João Carlos de Andrade e Mônica F. de Abreu

TRABALHOS PUBLICADOS

de Andrade, J. C.; Fioravanti, L. M. A.; de Abreu, M. F., "Determination of Bicarbonate in Substrate Extracts Using Back-Titration and the Gran Plot Approach". **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 36, 2359-2366, 2005.

RESUMO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE DE POLI(METILFENILSILOXANO) SOBRE SÍLICA SORVIDA E IMOBILIZADA POR RADIAÇÃO MICROONDA

Autora: Livia Maria Andrekowisk Fioravanti

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

Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a coluna é um dos principais componentes do sistema cromatográfico, pois é nela que ocorre a separação. Dessa forma, a busca por fases estacionárias (FE) capazes de realizar separações com alta eficiência e bom desempenho tem sido uma constante em muitos laboratórios de pesquisa. Polissiloxanos substituídos com grupos fenil têm sido intensamente utilizados em cromatografia gasosa, mas a sua aplicação em CLAE tem despertado pouca atenção. Este trabalho apresenta a preparação de FE para CLAE a partir da imobilização de poli(metilfenilsiloxano), por radiação microonda, sobre suporte de sílica. As FE foram caracterizadas por testes físico-químicos e cromatográficos. Escolheu-se a radiação microonda por se mostrar promissora e pouco estudada para imobilização de FE. Para a escolha das melhores condições de radiação foi aplicado um planejamento fatorial, sendo que a potência e o tempo de radiação que resultaram em fases com melhor desempenho cromatográfico foram de 720 W por 70 minutos. Nestas condições, as FE apresentaram alta eficiência (78.000 pratos m^{-1}), picos simétricos (com fator de assimetria entre 0,9 e 1,2) para compostos apolares e básicos e boa resolução entre os compostos analisados. Os parâmetros cromatográficos indicaram que a radiação microonda melhorou o desempenho das FE, proporcionou um aumento da sua estabilidade frente à fase móvel alcalina e forneceu um bom recobrimento da superfície da sílica pelo polímero. A FE preparada mostrou-se promissora na separação de compostos aromáticos neutros e básicos, como fármacos contendo grupos nitrogenados e agrotóxicos.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SORBED AND MICROWAVE IMMOBILIZED HPLC STATIONARY PHASES OF POLY(METHYLPHENYLSILOXANE) ON SILICA

Author: Lívia Maria Andrekowisk Fioravanti

Supervisor: Dr. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

In high performance liquid chromatography (HPLC), the column is one of the most important components of the chromatographic system, because it is in the column that the separation occurs. In this way, the search for stationary phases (SP) able to achieve separations with high efficiency has been a constant in many research laboratories. Phenyl substituted polysiloxanes have been used extensively in gas chromatography, but their application in HPLC has received little attention. This work presents the development of stationary phases for use in HPLC by immobilization of poly(methylphenylsiloxane) by microwave radiation on a silica support. The SP were characterized by physicochemical and chromatographic tests. Microwave radiation was chosen because it appears to be promising and has been little studied for SP immobilization. The best conditions of radiation were chosen using an experimental design, with the microwave power and the radiation time that provided phases with the best chromatographic performance, these being 720 W and 70 minutes. In these conditions, the SP showed high efficiency (78000 plates m^{-1}), symmetrical peaks (asymmetry factor between 0.9 and 1.2) for nonpolar and basic compounds and good separation for the compounds analyzed. The chromatographic parameters show that microwave radiation improved the performance of the SP and provided an increase in stability in alkaline mobile phases. Besides, it provided a good polymer cover on silica surface, being a promising SP for the separation of neutral and basic aromatic compounds, such as pharmaceuticals with nitrogen groups and agrochemicals.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Suportes Cromatográficos	20
1.2. Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas	22
1.3. Fases Estacionárias com Polímeros Sorvidos ou Imobilizados	25
1.4. Poli(metilfenilsiloxano) – PMFS	28
1.5. Radiação Microonda	30
1.6. Avaliação das Colunas Cromatográficas	32
1.7. Emprego da Quimiometria	37
2. OBJETIVOS	39
3. PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1. Reagentes	40
3.2. Equipamentos	41
3.3. Suporte Cromatográfico	42
3.4. Fase Estacionária Líquida	42
3.5. Coluna Cromatográfica	43
3.5.1. Polimento das colunas	44
3.6. Preparo das Fases Estacionárias	44
3.6.1. Sorção da fase líquida ao suporte	44
3.6.2. Processo de imobilização do polímero ao suporte cromatográfico	45
3.6.2.1. Auto-imobilização das fases estacionárias	45
3.6.2.2. Radiação Microonda	46
3.6.3. Extração do excesso de polímero	47
3.7. Caracterização Físico-Química das Fases Estacionárias	48
3.7.1. Porcentagem de carbono	48
3.7.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros	50
3.7.3. Cromatografia por exclusão através de permeação em gel	50
3.7.4. Análise termogravimétrica	51

3.7.5. Espectroscopia de absorção no infravermelho	51
3.7.6. Ressonância magnética nuclear de carbono 13 e silício 29 (RMN ¹³ C e ²⁹ Si)	51
3.8. Enchimento das Colunas Cromatográficas.....	52
3.8.1. Suspensão da fase estacionária	52
3.8.2. Recheio das colunas com a fase estacionária	52
3.9. Preparo das Fases Móveis	54
3.10. Condicionamento das Colunas	55
3.11. Avaliação Cromatográfica das Fases Estacionárias.....	55
3.11.1. Misturas testes usadas para a avaliação cromatográfica.....	56
3.12. Avaliação da Aplicabilidade das Fases Estacionárias	59
3.12.1. Separação de agrotóxicos.....	59
3.13. Teste de Estabilidade	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Análise Termogravimétrica	61
4.2. Preparo das Fases Estacionárias	62
4.2.1. Estudo da Sorção do PMFS Sobre Sílica.....	62
4.2.2. Determinação das Condições Cromatográficas Ótimas Para Avaliação das Fases Estacionárias	64
4.2.3. Avaliação da Carga do Polímero.....	67
4.2.4. Avaliação Cromatográfica dos Procedimentos de Imobilização do PMFS Sobre a Sílica.....	68
4.3. Caracterização Físico-Química das Fases Si-PMFS.....	76
4.3.1. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro.....	76
4.3.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	77
4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN ¹³ C e ²⁹ Si)	78
4.4. Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária Otimizada.....	81
4.4.1. Mistura Teste de Engelhardt e Jungheim.....	81
4.4.2. Misturas Testes de Tanaka.....	83
4.4.3. Misturas Testes de Szabó.....	87

4.5. Avaliação da Aplicabilidade das Fases Estacionárias	90
4.5.1. Separação de Agrotóxicos	90
4.6. Estabilidade Química da Fase Estacionária	91
5. CONCLUSÕES	94
6. BIBLIOGRAFIA	96

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e potência de radiação microonda para a imobilização das fases Si-PMFS. 46
- Tabela 2.** Parâmetros cromatográficos, porcentagem de PMFS e espessura da camada polimérica obtidas na avaliação da influência da carga do polímero, usando fase móvel metanol:água 60:40 (v/v) e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹. 67
- Tabela 3.** Parâmetros cromatográficos das fases Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda para o acenafteno e N,N-dimetilanilina e as suas respectivas porcentagens de PMFS e espessura da camada polimérica. 69
- Tabela 4.** Análise da variância do modelo quadrático ajustado às eficiências da coluna para o pico do acenafteno. 71
- Tabela 5.** Análise da variância do modelo quadrático ajustado aos fatores de assimetria para o pico do acenafteno. 72
- Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos de alguns compostos da MT 1 e MT 2 obtidos em uma coluna recheada com a fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 80 minutos. 75
- Tabela 7.** Características da sílica nua e FE Si-PMFS imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos. 76
- Tabela 8.** Parâmetros cromatográficos obtidos na análise da mistura de Engelhardt e Jungheim usando a fase de Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos. 82
- Tabela 9.** Parâmetros cromatográficos da fase Si-PMFS obtida pelo protocolo de Tanaka. 85
- Tabela 10.** Parâmetros cromatográficos obtidos para os 7 hidrocarbonetos aromáticos na fase Si-PMFS. 88
- Tabela 11.** Parâmetros cromatográficos obtidos para os 5 hidrocarbonetos aromáticos na fase Si-PMFS. 89

Tabela 12. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de 5 agrotóxicos usando a fase Si-PMFS. 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.	21
Figura 2. Reação de organossilanização para o preparo de fases estacionárias quimicamente ligadas.	22
Figura 3. Agentes silanos empregados na organossilanização de fases estacionárias, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). R = normalmente CH ₃ , R' = comumente C8 ou C18, X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro.	23
Figura 4. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (A) ou preenchimento do volume dos poros (B).	27
Figura 5. Esquema da resposta de uma molécula a um campo eletromagnético aplicado: (A) Moléculas polarizadas alinhadas com os pólos do campo eletromagnético; (B) Desordem térmica induzida pela remoção do campo eletromagnético.	31
Figura 6. Esquema de um forno microonda.	32
Figura 7. Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos.	33
Figura 8. Determinação do fator de assimetria.	35
Figura 9. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.	36
Figura 10. Planejamento composto central para duas variáveis. (◆) planejamento fatorial 2 ² , (+) ponto central e (●) planejamento axial.	38
Figura 11. Estrutura molecular do polímero.	42
Figura 12. Representação esquemática do sistema de enchimento das colunas.	53

Figura 13. Estrutura química dos agrotóxicos estudados.	60
Figura 14. Termogramas (A) do PMFS e (B) da sílica nua em atmosfera oxidante.	61
Figura 15. Cromatogramas obtidos com as fases Si-PMFS sorvidas por diferentes períodos e suas porcentagens de carbono. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.	63
Figura 16. Cromatogramas obtidos na seleção da composição da fase móvel para a avaliação das fases de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; vazão: 0,4 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5) naftaleno.	65
Figura 17. Cromatogramas obtidos na separação de duas FE Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda a 700 W por 70 minutos extraídas com clorofórmio e metanol (A) logo após a imobilização e (B) após 6 dias da imobilização. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5) naftaleno.	66
Figura 18. Curva de van Deemter para uma fase estacionária de Si-PMFS imobilizada por radiação microonda.	67
Figura 19. Efeito das variáveis estudadas e de sua interação, na eficiência de coluna das fases estacionárias Si-PMFS imobilizada por radiação microonda. ...	71
Figura 20. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) baseada na eficiência de coluna para o acenafteno.	73
Figura 21. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) baseada no fator de assimetria de coluna para o acenafteno.	74
Figura 22. Cromatogramas mostrando a separação da MT 1 (A) e MT 2 (B) empregando a fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: A) MT 1 - (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5)	

naftaleno. B) MT 2 - (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 75

Figura 23. Espectros de absorção no infravermelho (A) Sílica Nua e Poli(metilfenilsiloxano) e (B) Fase sorvida por 90 dias e Fase imobilizada a 720 W por 70 minutos de radiação microonda. 77

Figura 24. Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies de silício de interesse. 79

Figura 25. Espectros de RMN de ^{29}Si de A) sílica nua e B) fase estacionária imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos. 80

Figura 26. Espectros de RMN ^{13}C da fase estacionária imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos. 81

Figura 27. Cromatograma obtido na separação da mistura teste de Engelhardt e Jungheim pela fase de Si-PMFS preparada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos teste: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno. 82

Figura 28. Cromatograma obtido na separação da mistura A do protocolo de Tanaka pela fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 80:20 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) trifenileno e (5) o-terfenil. 84

Figura 29. Cromatograma obtido na separação da mistura B do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção : 5 μL ; fase móvel: metanol:água 30:70 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) cafeína e (3) fenol. .. 85

Figura 30. Cromatograma obtido na separação da mistura C do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 7,6; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas. 86

Figura 31. Cromatograma obtido na separação da mistura D do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 2,7; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzilamina, (3) fenol e (*) impurezas. 87

Figura 32. Cromatograma obtido na separação de 7 hidrocarbonetos aromáticos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Compostos: (1) uracila, (2) fenol, (3) m-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) p-xileno e (8) propilbenzeno. 88

Figura 33. Cromatograma obtido na separação de 5 hidrocarbonetos aromáticos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Compostos: (1) uracila, (2) benzeno, (3) tolueno, (4) etilbenzeno, (5) propilbenzeno e (6) butilbenzeno. 89

Figura 34. Cromatograma obtido na separação de 5 agrotóxicos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Agrotóxicos: (1) imazaquim, (2) cianazina, (3) atrazina, (4) diurom, (5) linurom e (*) impurezas. 90

Figura 35. Resultados em termos de porcentagem de eficiência (A), fator de assimetria (B) e fator de retenção (C) calculados para o acenafteno nos testes de estabilidade da FE usando a fase móvel $\text{MeOH}:\text{NaHCO}_3$ 0,05 mol L^{-1} + NaOH pH 9,0 50:50 (v/v) a 40 $^\circ\text{C}$ 92

Figura 36. Resultado em termo de fator de assimetria, calculado para a N,N-dimetilanilina, nos testes de estabilidade da FE usando como fase móvel $\text{MeOH}:\text{NaHCO}_3$ 0,05 mol L^{-1} + NaOH pH 9,0 50:50 (v/v) a 40 $^\circ\text{C}$ 93

1. INTRODUÇÃO

Em muitos laboratórios analíticos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se tornou uma técnica indispensável para a análise de amostras, determinação de constantes físicas e isolamento de compostos puros em misturas complexas. Atualmente, a CLAE tem sido empregada como técnica analítica não só em pesquisas científicas, mas também em indústrias farmacêuticas (controle de qualidade), alimentícias (determinação de toxinas e quantificação de nutrientes), em laboratórios de controle ambiental (monitoramento e análise de agrotóxicos e outros contaminantes em água e solo), em laboratórios de análises clínicas e em indústrias de polímeros¹.

O desenvolvimento contínuo e a disponibilidade de equipamento de alta eficiência e de fases estacionárias de alta qualidade têm propiciado substancialmente o crescimento das pesquisas e das aplicações da CLAE¹.

Essencialmente, a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária (Fase Estacionária - FE) enquanto a outra (Fase Móvel - FM) é percolada através dela em uma direção definida. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido, resultando em migrações diferenciadas².

Entre os diferentes modos disponíveis de separação por CLAE, cromatografia líquida em fase normal^a, cromatografia líquida em fase reversa^b (CLAE-FR), exclusão, troca iônica e outros, a CLAE-FR é a mais usada. A grande popularidade da CLAE-FR se deve principalmente as suas inúmeras vantagens, tais como: uso de fases móveis de menor custo por ter água em sua composição, rápido equilíbrio da coluna após a mudança de FM, possibilidade de empregar

^a CLAE que utiliza fases estacionárias polares com fase móveis orgânicas.

^b CLAE que utiliza fases estacionárias apolares com fase móveis aquosas, contendo várias proporções de modificadores orgânicos miscíveis.

eluição por gradiente, resultando em maior rapidez da análise, amplo campo de atuação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades, dentre outras vantagens³.

As fases estacionárias reversas são comumente constituídas de espécies orgânicas sorvidas, imobilizadas ou, mais freqüentemente, quimicamente ligadas a um óxido inorgânico (suporte cromatográfico).

Hoje em dia, colunas de Fase Reversa (FR) são amplamente estudadas e entre os vários focos de estudo, este trabalho dedicou-se ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de uma nova FE, levando em consideração a seletividade, eficiência, estabilidade química e durabilidade.

1.1. Suportes Cromatográficos

Os principais suportes são de origem inorgânica ou polímeros orgânicos. Cada tipo de material apresenta vantagens e desvantagens e a escolha de um material apropriado é governada pelas necessidades da separação desejada⁴.

Sem dúvida a sílica é o suporte mais utilizado para a preparação de fases estacionárias tipo reversa, pois é mecanicamente estável às altas pressões. Além do mais, este suporte não incha ou encolhe quando exposto aos solventes orgânicos, ao contrário de polímeros orgânicos, como polimetacrilato ou poliestireno, que incham quando certos solventes são usados como fases móveis, resultando em uma limitada resistência a pressões elevadas. Finalmente, a sílica pode ser facilmente modificada, existe um vasto conhecimento de sua estrutura e suas propriedades e é comercialmente disponível em uma grande variedade de tamanho de partículas, formas e tamanhos de poros⁴. Por estes motivos, a sílica parece ser o material de partida mais qualificado para a produção de fases estacionárias para CLAE.

Entender a superfície da sílica é importante para a interpretação de suas propriedades cromatográficas. Ela consiste em uma rede de grupos silanóis (Figura 1), alguns dos quais podem formar grupos siloxano ou ligações de hidrogênio entre si ou com a água.

Os grupos silanóis são os centros de adsorção na cromatografia em fase normal. Eles são hidrofílicos e interagem com grupos funcionais da fase móvel e das moléculas dos analitos. Em cromatografia em fase reversa, podem atuar como âncoras para ligações covalentes de polímeros ou substâncias que possuam um grupamento funcional apropriado⁵.

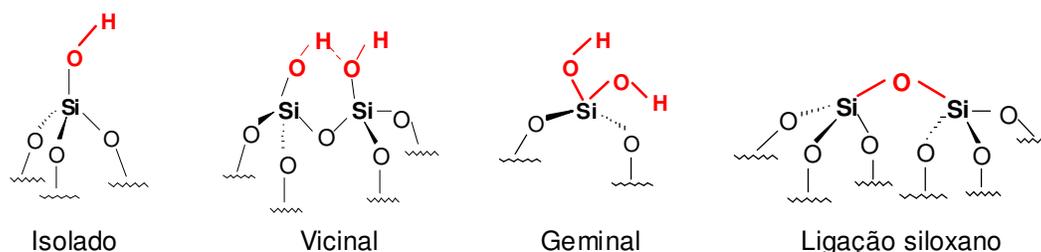


Figura 1. Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.

Comparada com outros suportes, a sílica apresenta inúmeras vantagens em termos de eficiência e desempenho, mas ela não é um suporte perfeito para CLAE. Os grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) são ácidos e podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas básicas e adsorvê-las. Quando a adsorção é reversível, tem-se o problema de picos largos, assimétricos e com cauda, além de poderem se sobrepor ou interferirem nos picos de outros solutos que eluem com tempos de retenção similares. Muitas vezes, a adsorção pode ser irreversível e os compostos depositados na superfície cromatográfica podem restringir o transporte de massa, bloquear sítios de interação normal ou criar sítios ativos não específicos^{4,6}.

Um outro aspecto é a instabilidade das fases estacionárias sintetizadas baseadas em sílica tanto frente a fases móveis ácidas como básicas (devido à presença de grupos silanóis residuais). Dependendo do pH, os grupos silanóis e siloxanos se dissociam, causando perda da fase estacionária e colapso da estrutura do leito da coluna^{7,8}.

Impureza metálica é outra fonte de perda da eficiência cromatográfica e assimetria dos picos. O teor de metais depende do processo de síntese e das matérias-primas utilizadas, mas geralmente, a sílica usada em cromatografia contém cerca de 0,1 a 0,3 % de metal. O grande problema é que determinados íons metálicos, tais como: Na, K, Mg, Al, Ca, Ti, Fe, Mn, Mo e Zr, aumentam a

acidez dos silanóis vizinhos, pois tornam os hidrogênios na superfície da sílica com menor carga formal, interagindo indiretamente com compostos básicos⁹.

Para evitar o problema de instabilidade da fase estacionária em soluções ácidas (pH < 2) ou básicas (pH > 8), existe a possibilidade de substituir a sílica por outros suportes, tais como:

- Celulose ou polímeros de estireno-divinilbenzeno: possuem baixa resistência às altas pressões¹⁰.
- Óxidos inorgânicos (alumina, titânia e zircônia): possuem menor eficiência¹⁰.

Uma outra possibilidade é a modificação da superfície da sílica. A modificação superficial da sílica com os óxidos de zircônio e titânio já foi relatada, com resultados promissores, após a preparação de fases estacionárias com polímero adsorvido e imobilizado na sua superfície^{4,11}.

1.2. Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas

Para se obter a fase reversa, é necessário introduzir grupos orgânicos apolares sobre a superfície do suporte. O método mais comum ocorre através da introdução de monocamadas orgânicas via reação com reagentes apropriados, produzindo as chamadas fases quimicamente ligadas. Neste tipo de fase, as cadeias orgânicas são ligadas covalentemente à superfície do suporte fornecendo alta estabilidade hidrolítica ao líquido estacionário¹².

Existem vários procedimentos para a formação de uma camada quimicamente ligada sobre a superfície de óxidos, como a esterificação, cloração seguida de reação com reagente de Grignard ou com nitrogênio e a organossilanização, que é a mais usada (Figura 2).

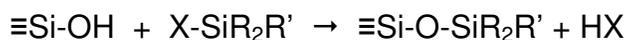


Figura 2. Reação de organossilanização para o preparo de fases estacionárias quimicamente ligadas.

Na organossilanização¹³, as fases ligadas são preparadas pela reação dos grupos silanóis da sílica com reagentes organossilanos resultando em FE com ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$). As FE deste tipo são estáveis

hidroliticamente e as colunas recheadas com este material exibem eficiências altas devido aos rápidos efeitos de transferência de massa. O agente silano pode ser monofuncional, bifuncional ou trifuncional (Figura 3). Dependendo destas funções, as fases apresentam características físicas e cromatográficas bastantes distintas. Utilizando-se silanos mono, bi ou trifuncionais na ausência de água tem-se as fases monoméricas e silanos bi ou trifuncionais na presença de água geram reações cruzadas que levam à polimerização vertical do modificador e, conseqüentemente, as fases estacionárias poliméricas.

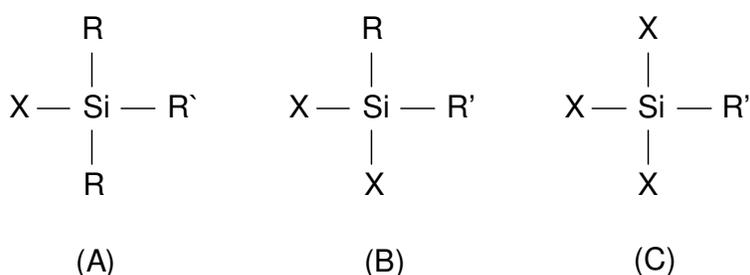


Figura 3. Agentes silanos empregados na organossilanização de fases estacionárias, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). R = normalmente CH₃, R' = comumente C8 ou C18, X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro.

As colunas cromatográficas recheadas com a fase monomérica apresentam eficiências mais altas devido à cinética favorável envolvendo a rápida difusão dentro e fora da camada fina da FE. No entanto, o principal inconveniente do preparo deste tipo de fase é que mais de 50 % dos grupos silanóis da sílica permanece sem reagir (silanóis residuais), após o processo de síntese. Esta baixa concentração do ligante na superfície está associada ao impedimento estérico ocasionado pelos volumosos agentes silanos empregados na reação. Embora os silanóis residuais não estejam disponíveis para a reação com os agentes silanos, alguns são suficientemente acessíveis para interagirem com compostos durante a separação cromatográfica. Os silanóis residuais são os principais responsáveis pelo aumento da retenção e alargamento de pico de compostos básicos¹⁴.

Para contornar o problema dos silanóis residuais, diversas alternativas de preparo de fases ligadas são sugeridas, tais como:

- Capeamento¹²: após a ligação das espécies químicas na superfície da sílica, a FE é submetida a uma segunda reação com um agente sililante apropriado (trimetilclorossilano e/ou hexametildisilazano), reduzindo o número de silanóis residuais.
- Fases poliméricas^{15,16,17}: são obtidas pela reação de agente silano bi ou trifuncional na presença de traços de água. Apesar da maior estabilidade hidrolítica desta fase, a dificuldade de controlar a reação de entrecruzamento e a espessura da camada resultante torna o processo pouco reproduzível, sendo raramente formada uma camada uniforme.
- Fases com polimerização horizontal¹⁸: neste método, monocamadas auto-organizadas de silanos trifuncionais de cadeias longas (C8, C18) e curtas (C1) são ligadas sobre as partículas de sílica melhorando a estabilidade hidrolítica das fases com substancial redução do acesso aos silanóis residuais. Além disso, o processo de obtenção destas fases é altamente reproduzível.
- Fases estericamente protegidas^{19,20}: são obtidas pela reação de um reagente organossilano contendo a espécie química (C8 ou C18) na cadeia lateral e dois grupos alquilas volumosos (isopropil ou tert-butil) que restringem o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais.
- Fases estacionárias com grupos polares embutidos²¹: trata-se de um método alternativo de redução da atividade dos silanóis residuais, pois a inserção de grupos polares (como amida, amina, uréia e carbamato) promove uma competição destes com os solutos básicos pelos silanóis residuais, estabelecendo uma redução da atividade silanofílica.
- Fases estacionárias bidentadas^{19,22}: preparadas a partir de silanos bifuncionais, proporcionam maior restrição ao acesso de silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas fases móveis com altos e baixos valores de pH.

1.3. Fases Estacionárias com Polímeros Sorvidos ou Imobilizados

Uma outra estratégia desenvolvida para evitar as interações indesejáveis de solutos com os grupos silanóis residuais oriundos das FE quimicamente ligadas com baixa concentração de ligantes foram as FE recobertas com polímeros. Na prática, as FE quimicamente ligadas com “ligantes pequenos” não protegem suficientemente os solutos da interação com os silanóis residuais, assim, uma proteção mais eficiente pode ser alcançada com a imobilização de macromoléculas na superfície e nos poros da sílica^{4,5,22}.

Em princípio, as fases estacionárias recobertas com polímeros combinam as propriedades mecânicas de óxidos inorgânicos com a inércia química e a versatilidade de polímeros orgânicos^{22,23}. Estas fases apresentam uma série de vantagens que as tornam extremamente atrativas para uso em CLAE-FR, tais como: melhor proteção dos silanóis residuais (sílica) ou de sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia, alumina), quando comparada às FE quimicamente ligadas e maior facilidade de preparo^{22,23}. Além disso, a seletividade destas fases depende essencialmente dos grupos funcionais do polímero imobilizado. Devido à disponibilidade de uma vasta gama de polímeros com diferentes funcionalidades, as fases recobertas com polímeros permitem o ajuste flexível da seletividade cromatográfica dentro de uma ampla faixa, bastando escolher o polímero apropriado para a separação desejada.

Uma grande variedade de polímeros foi empregada no preparo de fases estacionárias recobertas para CLAE-FR, dentre estes se destacam: poli(etileno), poli(butadieno), poli(estireno) e, principalmente, os polissiloxanos, [poli(dimetilsiloxano), poli(metiloctilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano)].

A forma mais simples de preparo das fases recobertas com polímeros é pela deposição de uma camada polimérica sobre o suporte^{24,25}. Para isto, o polímero é dissolvido em um solvente apropriado, no qual ele seja completamente solúvel e, a esta solução com polímero é adicionado o suporte cromatográfico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida. A sorção do polímero no suporte cromatográfico é um processo complexo governado por um balanço

muito sutil entre fatores energéticos e entrópicos e deve ser controlado cuidadosamente para a obtenção de fases estacionárias confiáveis e reproduzíveis²⁶. A química da superfície do suporte também tem uma influência significativa na sorção dos polímeros. Os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoramento, nos quais os polímeros podem se ligar covalentemente^{27,28,29} ou apenas interagir fracamente^{24,25,30,31,32}.

Outro ponto a ser destacado na preparação destas fases é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se, por um lado, uma maior quantidade de polímero fornecerá um material com maior proteção dos silanóis ou sítios ácidos de Lewis contra interações indesejáveis com a amostra, por outro lado, resultará em uma camada mais espessa e bloqueio dos poros do suporte que, por conseguinte, resultará em um processo de transferência de massa mais lento e, portanto, FE com eficiência reduzida. Portanto, a preparação das fases recobertas com polímeros é uma etapa crítica que tem por finalidade a obtenção de duas propriedades idealizadas:

- (1) Um filme fino que não bloqueie a entrada dos poros para manter a estrutura geral e a conectividade e resultar em rápida transferência de massa nos poros e no filme polimérico.
- (2) Uma camada polimérica uniforme para recobrir completamente os sítios não específicos de interações indesejáveis e, se possível, impermeável aos outros solutos a serem separados.

Existem várias formas de se fazer o recobrimento. O mais comumente empregado consiste na adsorção física de um polímero pré-sintetizado, com composição química bem definida sobre o suporte cromatográfico²². Ou, alternativamente, o polímero pode ser depositado pela polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros iniciada ou propagada na superfície do suporte³³. A primeira forma é preferida por fornecer maior reprodutibilidade no preparo das FE²².

Basicamente, o polímero sorvido pode formar um filme fino na superfície da sílica (Figura 4A) ou preencher o volume do poro (Figura 4B), é possível também haver uma combinação destas duas formas. Em ambos os casos as cadeias

poliméricas podem apenas recobrir (por mecanismo de sorção) as paredes dos poros sem entrecruzamento e sem ligar à superfície (representado no lado esquerdo da Figura 4A e B), pode formar uma camada densamente entrecruzada sem ligação química com a superfície dos poros (parte central) ou então pode se ligar quimicamente às paredes dos poros (representado no lado direito da Figura 4A e B). Porém, se a sorção do polímero ao suporte for governada por forças de interação fraca, ele poderá ser facilmente removido durante a passagem da FM. Faz-se necessário, portanto, uma etapa de imobilização posterior à sorção para melhor “ancoramento” do polímero ao suporte, dando uma maior estabilidade à FE.

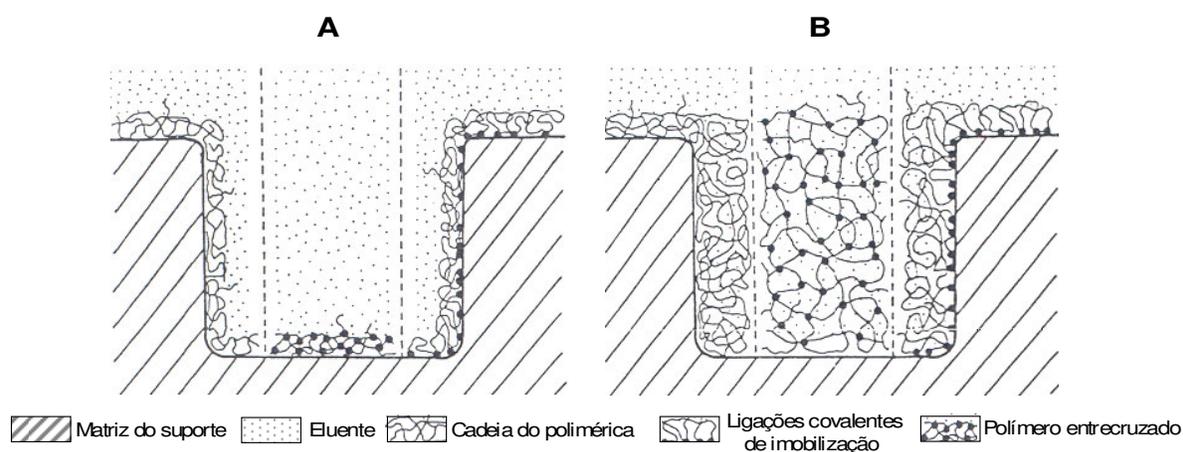


Figura 4. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (A) ou preenchimento do volume dos poros (B).

Os métodos de imobilização de polímeros atuais são originários das várias técnicas para a criação de camadas poliméricas em materiais de vidro ou de sílica, da experiência de fases estacionárias poliméricas em suportes para cromatografia gasosa e das várias técnicas para modificação de suportes para cromatografia líquida clássica, antes do desenvolvimento da CLAE. Porém, o grande avanço conquistado nos procedimentos de imobilização de polímeros aconteceu com a introdução de micropartículas de sílica porosas, pois diminuiu o risco de entupimento dos poros e possibilitou altas eficiências de separação, comparadas às sílicas modificadas com ligantes de baixa massa molar usados no passado⁵.

Atualmente, as FE imobilizadas são obtidas por reações entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, induzidas ou não por processos de entrecruzamento, ou entre a fase líquida e o suporte³⁴ (Figura 4). Estas reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis, quando comparadas com as FE sorvidas, e são insolúveis nas fases móveis comumente empregadas em CLAE-FR. Vários métodos são empregados para que estas reações ocorram, tais como: reticulação induzida por agentes químicos tais como peróxidos e azocompostos³⁵, auto-imobilização³⁴, tratamento térmico^{31,34}, radiação gama³² e radiação microonda^{30,36,37,38}.

Ao longo dos últimos 17 anos, o LabCrom tem direcionado esforços para o preparo de FE com polímeros [poli(butadieno)³⁶ e polissiloxanos^{24,25,30-32,38}] sorvidos e imobilizados por diferentes tratamentos sobre suportes de sílica e sílica metalizada, sem a utilização de agentes químicos para indução do entrecruzamento das cadeias poliméricas. O principal foco destes estudos tem sido a obtenção de fases estacionárias com maior estabilidade química em condições drásticas de fase móvel.

Neste trabalho estudou-se a imobilização do poli(metilfenilsiloxano) por radiação microonda. Escolheu-se esta técnica, dentre as várias técnicas de imobilização, por se mostrar promissora e pouco estudada para este fim.

1.4. Poli(metilfenilsiloxano) – PMFS

A busca por fases estacionárias capazes de realizar separações cromatográficas de compostos de carácter básico como peptídeos, por exemplo, é uma constante nos laboratórios de pesquisas. O reflexo disso pode ser observado na grande quantidade de trabalhos publicados em revistas especializadas^{39,40,41,42}. Os escopos destes trabalhos concentram-se na introdução de grupos polares nas fases apolares comumente utilizadas para CLAE-FR, ou na mistura de polímeros com polaridades diferentes, na tentativa de se conseguir polaridades intermediárias.

Polissiloxanos fenil substituídos têm sido extensivamente utilizados em cromatografia gasosa⁴³, entretanto, sua imobilização sobre a superfície da sílica para utilização em CLAE tem despertado pouca atenção. Neimark e Chertov⁴⁴ foram os primeiros a ligarem grupos fenil à superfície da sílica utilizando feniltriclorossilano e difenildiclorossilano. Posteriormente, diferentes polissiloxanos fenil substituídos foram utilizados para modificar a superfície da sílica obtendo-se fases estacionárias de diferentes polaridades⁴⁵.

A presença de anéis aromáticos confere à fase estacionária uma polaridade intermediária e tem um papel importante, graças às interações π - π com os analitos^{46,47}. Salo e Herrala⁴⁷ observaram um aumento da retenção de retinóides com o aumento do número de elétrons π em sua molécula, quando separadas em uma FE aromática.

Em um estudo realizado, Goss⁴⁸ comparou o desempenho de duas colunas disponíveis comercialmente, uma com grupo fenil e outra com C18, na separação de ácido salicílico, algumas de suas impurezas e metabólitos. Os resultados mostraram uma melhora na simetria e resolução entre os picos quando separados em uma coluna com grupos fenil e, além disso, houve uma alteração na ordem de eluição dos compostos, sugerindo diferentes interações entre os analitos e os dois tipos de fases estacionárias.

Yang et al.⁴⁶ sintetizaram cinco fases estacionárias com grupo fenil com diferentes graus de polimerização através da ligação de poli(metilfenilsiloxanos) com os OH terminais na superfície da sílica gel. As fases preparadas foram avaliadas e comparadas com uma coluna C18 disponível comercialmente. Os resultados das determinações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e ciclossiloxanos indicaram, claramente, uma contribuição significativa das interações π - π das fases estacionárias com grupo fenil no processo de separação.

Três diferentes fases estacionárias foram preparadas por Szabó et al.⁴⁹ utilizando sílica modificada por fenil-metil-diclorossilano, di-fenil-diclorossilano e tri-fenil-clorossilano. O efeito na separação e na seletividade das diferentes fases fenil preparadas foi avaliado e comparado com uma fase octadecil. A comparação entre as fases revelou que uma maior retenção foi observada para solutos de

polaridades menores na fase octadecil e para compostos aromáticos polares foi observada maior retenção nas fases com grupo fenil. A sílica gel modificada por fenil mostrou ser uma fase estacionária mais apropriada para análises de compostos aromáticos polares do que a fase octadecil.

Szabó et al.⁴⁵ realizaram um estudo comparativo utilizando três fases estacionárias preparadas com diferentes polissiloxanos fenil substituídos sobre a sílica e uma fase estacionária monomérica preparada com fenil-metil-diclorossilano. A ordem de eluição dos analitos utilizados foi à mesma para todas as fases estacionárias preparadas, entretanto as sílicas modificadas por polissiloxanos, fases poliméricas, mostraram-se melhores que a fase monomérica para separação de compostos aromáticos apolares. Em relação à fase monomérica, as sílicas modificadas por fenil-polissiloxanos não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de carbono e concentração dos grupos orgânicos na superfície, entretanto apresentaram características hidrofóbicas significativamente maiores. O aumento da hidrofobicidade observado foi causado por interações adicionais das ligações siloxano (essencialmente hidrofóbicas) do modificador polimérico com os solutos.

Em virtude das características interessantes já mencionadas e o número limitado de estudos realizados utilizando-se polissiloxanos fenil substituídos sobre a sílica, neste trabalho será explorada a aplicação de um novo polímero com grupo fenil com polaridade intermediária, como fase estacionária para CLAE.

1.5. Radiação Microonda

O uso da radiação microonda em química analítica já é conhecido desde a década de 70, sendo que entre as aplicações mais importantes pode-se citar a digestão de amostras para análise elementar, a extração de diversas substâncias e a dessorção térmica de vários compostos⁵⁰.

A microonda é uma radiação eletromagnética não ionizante, que possui uma frequência que vai de 300 a 300.000 MHz e que corresponde a comprimentos de

onda de 1 mm a 1 m. A região de microonda situa-se entre a região de infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético^{36-38,50,51}.

O aquecimento por microonda é completamente diferente daquele que ocorre por aquecimento térmico, uma vez que o aquecimento ocorre por condução, irradiação e convecção. O aquecimento por microonda é também chamado de aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que têm dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor. Como o campo elétrico na frequência de 2,45 GHz oscila (muda de sinal) $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, ocorre um pronto aquecimento destas moléculas^{36-38,50,51}. Uma representação esquemática é mostrada na Figura 5.

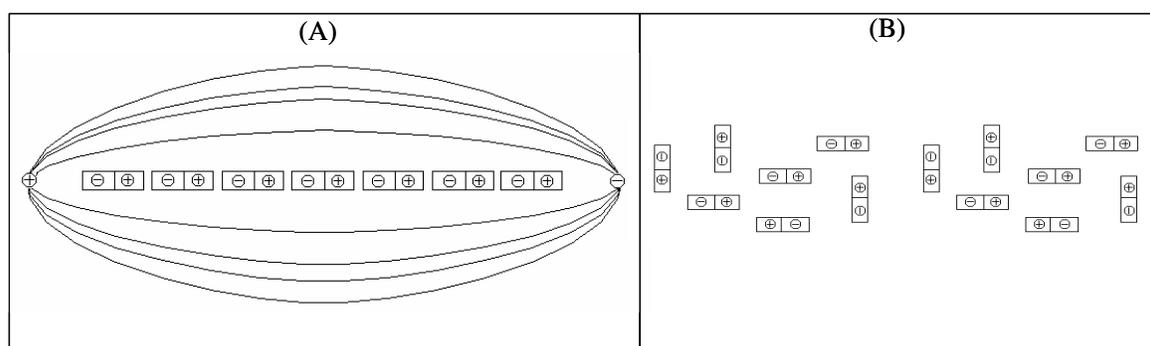


Figura 5. Esquema da resposta de uma molécula a um campo eletromagnético aplicado: (A) Moléculas polarizadas alinhadas com os pólos do campo eletromagnético; (B) Desordem térmica induzida pela remoção do campo eletromagnético.

Fonte: Sanseverino⁵⁰.

Em geral substâncias polares (água, acetonitrila, etanol) possuem alta capacidade em absorver a radiação microonda, enquanto que substâncias menos polares, hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos ou substâncias com momento de dipolo nulo como CCl_4 e CO_2 , absorvem a microonda fracamente.

Um aparelho de microonda típico, utilizado no aquecimento de amostras consiste dos seguintes componentes: o gerador de microonda magnetron, o guia de ondas, a cavidade da microonda, o agitador (para espalhar as ondas), um circulador e um exaustor de ar. A microonda é produzida pelo magnetron, propagada através do guia de ondas e inserida diretamente dentro da cavidade do forno onde o espalhador a distribui em diferentes direções sendo, então, absorvida pelas moléculas de amostras⁵¹. O esquema de funcionamento de um forno microonda está representado na Figura 6.

Alguns trabalhos desenvolvidos no LabCrom empregando a radiação microonda como forma de imobilização de poli(metiloctilsiloxano) sobre suporte de sílica³⁸ e de poli(butadieno) sobre partículas de sílica titanizada^{30,36,52} resultaram em fases estacionárias com bom desempenho cromatográfico e boa estabilidade em condições alcalinas de fase móvel.

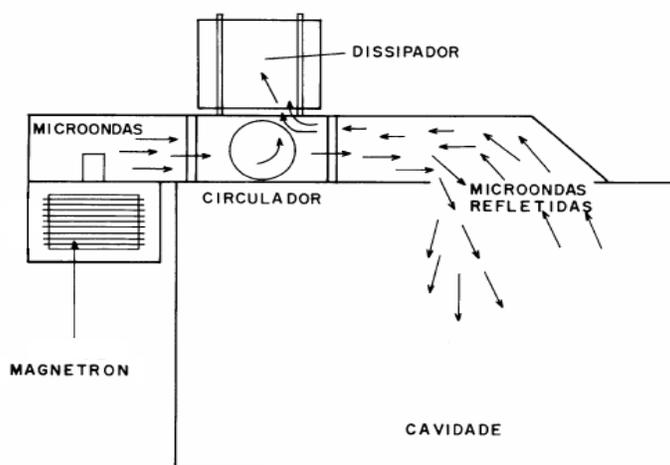


Figura 6. Esquema de um forno microonda.

Fonte: Barboza⁵³.

1.6. Avaliação das Colunas Cromatográficas

As colunas cromatográficas são avaliadas através da análise de parâmetros calculados² a partir de medidas obtidas nos cromatogramas de misturas de compostos previamente selecionados.

A Figura 7 mostra um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes.

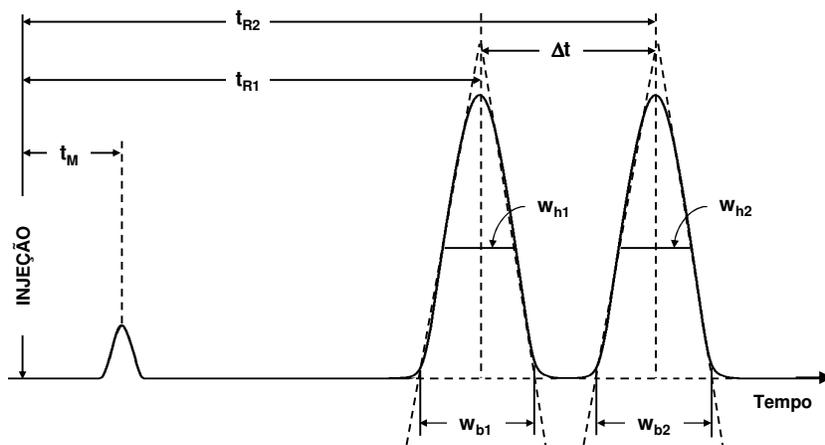


Figura 7. Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação dos parâmetros cromatográficos.

Fonte: Collins².

Tempo de retenção do soluto (t_R) é o tempo gasto desde o momento da injeção do soluto até a detecção do máximo do pico correspondente.

Tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária (t_M) é o tempo gasto por um composto não retido pela fase estacionária para percorrer o sistema cromatográfico desde a injeção até a chegada no detector. Normalmente é obtido pelo tempo gasto pela fase móvel, na qual está diluída a amostra.

Tempo de retenção ajustado (t'_R) é o tempo em que o soluto fica retido na fase estacionária, sendo calculado por:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1)$$

Fator de retenção (k) é calculado pela razão entre os tempos em que o soluto fica retido na fase estacionária e na fase móvel, sendo determinado pela Equação 2:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

Os valores ideais para k variam de 2,0 a 10,0. Valores menores que 2,0 indicam pouca interação entre o soluto e a fase estacionária, enquanto valores

maiores de 10 indicam interação muito forte com a fase estacionária, resultando em análises demoradas.

Resolução entre picos (R_s) é o parâmetro que indica se ocorreu ou não uma boa separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada pela Equação 3.

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) \quad (3)$$

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

w_{b1} e w_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo;

w_{h1} e w_{h2} = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Valores de R_s acima de 1,5 são considerados bons, indicando uma boa separação entre os picos.

Número de pratos (N) é o parâmetro relacionado à eficiência cromatográfica. Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação. Na prática, o número de pratos é uma medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito passa através do sistema e pode ser calculado pela Equação 4.

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

Como existem colunas com diferentes tamanhos, para poder compará-las é usual expressar a eficiência em pratos por metro (N/m)

$$N/m = \frac{N}{L} \quad (5)$$

onde: L = comprimento da coluna, em metros

Qualitativamente, a eficiência pode ser avaliada pelo formato do pico cromatográfico. Quanto mais estreito for o pico, maior é a eficiência da coluna na separação do soluto a que o pico se refere.

A expressão para o cálculo de número de pratos, ou seja, a eficiência descrita na equação 4, é válida para picos simétricos. Para picos assimétricos, existem

erros no cálculo de N se a equação 4 for utilizada. Por essa razão deve-se calcular o fator de assimetria (A_s) do pico a 10 % de sua altura.

Fator de assimetria do pico a 10 % da sua altura ($A_{s_{10}}$) é uma medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido horizontal a 10 % da sua altura. A literatura² indica que $A_{s_{10}}$ deve ter valores de 0,9 a 1,2. Embora menos desejáveis, valores até 1,6 são admitidos. Escolheu-se realizar a medida a 10 % da altura do pico devido à problemas de estabilidade da linha de base.

A Figura 8 mostra como é calculada a assimetria:

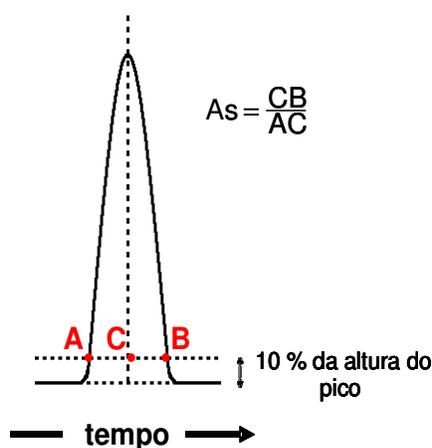


Figura 8. Determinação do fator de assimetria.
Fonte: Collins².

Avaliação comparativa entre colunas também pode ser feita usando a medida da altura de prato (H):

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

A eficiência de uma coluna também pode ser expressa através da equação clássica de van Deemter, em função da altura de prato (H):

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (7)$$

onde: μ = velocidade linear da fase móvel, obtida pela Equação 8:

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (8)$$

O termo A, da Equação 7, é a difusão turbilhonar responsável pelo alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto no interior da coluna cromatográfica. Uma forma de minimizar este efeito é utilizar colunas de diâmetro interno reduzido e partículas pequenas e uniformes.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na FM e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares de fase móvel.

O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre FM e a FE. O termo C está subdividido em C_M e C_S , onde C_M é a transferência de massa na FM e C_S , a transferência de massa na FE. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

O gráfico de H vs μ fornece uma curva como a da Figura 9 que é conhecida como curva de van Deemter. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$), na qual H terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica.

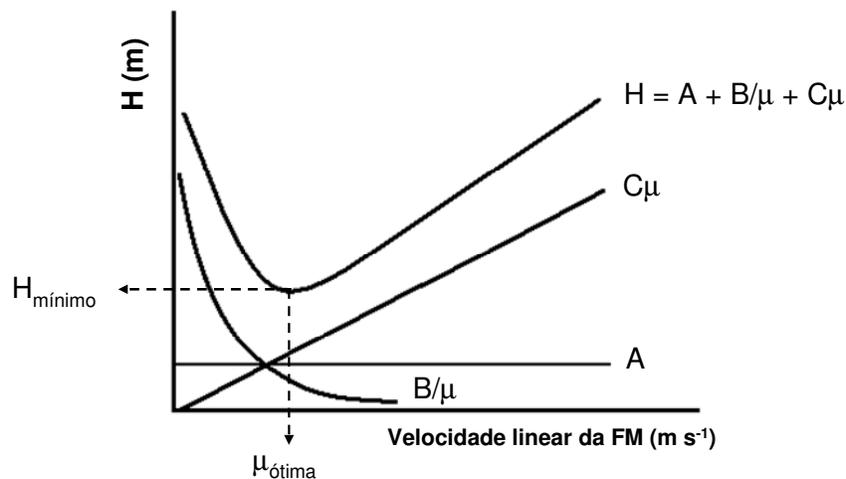


Figura 9. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.

Fonte: Collins².

1.7. Emprego da Quimiometria

A quimiometria^{54,55} 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, mas para isso, um bom planejamento é essencial.

A primeira etapa de um planejamento é determinar quais são os fatores (variáveis controladas pelo experimentador) e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. 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.

Quando a lista de variáveis a serem investigadas está completa, um planejamento experimental é escolhido para estimar a influência das diferentes variáveis nos resultados. O planejamento fatorial permite determinar a influência de todas as variáveis experimentais, bem como os seus efeitos de interação na resposta investigada. Para se fazer um planejamento fatorial completo, os experimentos devem ser realizados em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Desta forma, para k variáveis investigadas em dois níveis cada, serão necessários, pelo menos, 2^k experimentos. Ou seja, para duas variáveis investigadas são necessários, no mínimo, 4 experimentos. Porém, quando se conhece pouco sobre o procedimento experimental faz-se necessária uma triagem das variáveis que realmente influenciam os resultados, de forma significativa. Para a triagem de variáveis o planejamento recomendado é o fracionário, pois reduz os números de experimentos sem perder as informações de interesse.

Muitas vezes a determinação das variáveis que influenciam nos resultados e a intensidade desta influência são apenas uma das etapas do processo. Principalmente em química analítica, a otimização de um procedimento experimental é uma necessidade, seja para a redução de gastos ou de tempo, entre outros. Uma excelente ferramenta para otimização de um procedimento

analítico é a utilização de metodologia de superfície de resposta. A metodologia de superfícies de respostas é uma boa forma de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas. A única exigência que se faz para a determinação do ponto de ótimo (melhor resultado) é que a função polinomial que explica os resultados contenha termos quadráticos. Para ajustar os dados experimentais a um modelo quadrático, normalmente aplica-se o planejamento composto central. Este planejamento é dividido, basicamente, em três partes:

- Planejamento fatorial para determinar as variáveis que influenciam significativamente os resultados;
- Experimentos no ponto central. O ponto central é a condição intermediária aos níveis de todas as variáveis estudadas;
- Planejamento axial (ou estrela), que são experimentos realizados em pontos axiais, com distância $\pm \alpha$ da origem.

A Figura 10 apresenta um sistema de coordenadas situando cada etapa do planejamento composto central.

O planejamento experimental permite conclusões apenas dentro da região investigada (superfície de resposta), porém, é uma ferramenta bastante útil e confiável para otimização de processos em química analítica.

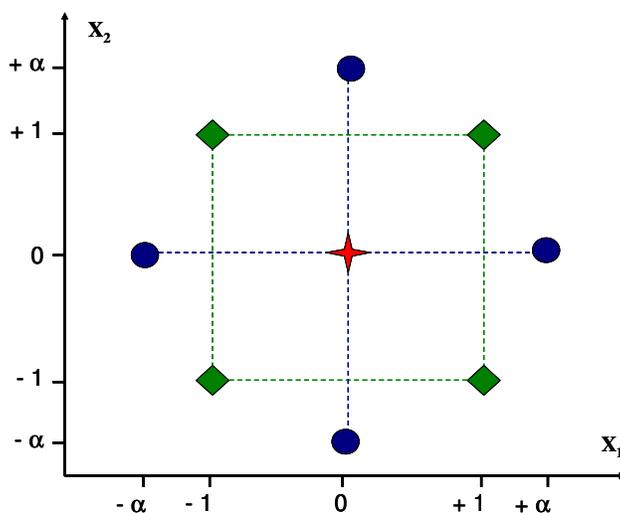


Figura 10. Planejamento composto central para duas variáveis. (◆) planejamento fatorial 2^2 , (+) ponto central e (●) planejamento axial.

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento e a caracterização, química e física, de FE para serem empregadas em CLAE-FR, baseadas na imobilização do poli(metilfenilsiloxano) na superfície de partículas de sílica. As fases estacionárias preparadas e otimizadas deverão apresentar bom desempenho cromatográfico e boa estabilidade química.

Para atingir tais objetivos, as seguintes etapas foram realizadas:

- Estudo da sorção do PMFS sobre o suporte de sílica;
- Imobilização do PMFS na sílica por radiação microonda.
- Escolha das melhores condições de irradiação, potência e tempo, através de um planejamento experimental;
- Avaliação física, química e cromatográfica das FE preparadas;
- Avaliação da aplicabilidade das FE na separação de diferentes classes de compostos.
- Avaliação da estabilidade química da FE otimizada em condição alcalina de fase móvel;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

- Acenafteno, 99%, Aldrich
- Acetofenona, 99%, Vetec
- Ácido fosfórico, 85%, Nuclear
- Ácido nítrico p.a., Synth
- Água deionizada, Milli-Q, Millipore
- Atrazina, 97,7%, adquirido na Novartis
- Anilina, 99,5%, Fluka
- Benzeno p.a., Synth
- Benzilamina, 99%, Merck
- Benzoato de metila, 99%, Merck
- Benzonitrila, Riedel – de Häen
- Butilbenzeno, 98%, Merk
- Cafeína, 100% USP, Aldrich
- Bicarbonato de sódio, 99%, Ecibra
- Cianazina, 98,0%, adquirido na Cyanamid
- Clorofórmio grau HPLC, Tedia
- Diclorometano p.a., Tedia
- Diurom, 99,3%, adquirido na Du Pont
- Etilbenzeno, Merck
- Fenol, 99%, Aldrich
- Fosfato de potássio monobásico anidro, 99%, Synth
- Fosfato de dipotássio dibásico anidro, 99%, Synth
- Hidróxido de sódio, 97%, Ecibra
- Imazaquim, 99,4%, Chem Service
- Isopropanol p.a., Tedia
- Linurom, 99,5%, adquirido na Hoescht
- Metanol grau HPLC, Tedia

- M-cresol, 99%, Merck
- Naftaleno, reagente puro Carlo Erba
- N,N-dimetilanilina, 98%, Fluka
- O-terfenila, 99%, Merck
- Pentilbenzeno, 98%, Merck
- Propilbenzeno, 98%, Aldrich
- P-xileno, 99%, Merck
- Tolueno p.a., Merck
- Trifenileno, 98%, Fluka
- Uracila, 98%, Aldrich

3.2. Equipamentos

- Agitador magnético, Corning Glass Works, modelo PC-351;
- Agitador rotatorque, Cole-Parmer, modelo 7637-01;
- Analisador de Volume de Poros ASAP 2010, Micromeritics;
- Analisador Elementar (CHN), Perkin Elmer 2400;
- Analisador Termogravimétrico, TA Instruments, modelo TGA-2050;
- Balança analítica, Fischer Scientific, modelo A-250;
- Banho de ultrassom, Thorton, modelo T14;
- Bomba de alta pressão, pneumática, pressurizada com nitrogênio, para enchimento de colunas, com faixa de pressão de 1000 a 15000 psi, Haskel, modelo 29769;
- Bomba de alta pressão, tipo recíproca, pistão duplo, Waters, modelo 510, para extração do excesso de polímero;
- Cromatógrafo a líquido constituído de bomba de alta pressão, tipo recíproca, pistão duplo, Waters, modelo 510; detector espectrofotométrico por absorção no UV-VIS de comprimento de onda variável, Shimadzu, modelo SPD-10A vp, utilizado em $\lambda = 254$ nm; injetor Rheodyne, com alça de amostragem de 5 μ L, modelo 7725i; sistema de aquisição de dados ChromPerfect for Windows 3.52 e Report Write Plus (Justice Innovations).

- Cromatógrafo de Permeação em Gel de Alta, Waters;
- Espectrômetro de absorção no infravermelho Perkin-Elmer, modelo FT-IR 1600;
- Espectrômetro de Ressonância Nuclear Magnética Bruker 300 Avance;
- Espectrômetro de Ressonância Nuclear Magnética Bruker 400 Avancell;
- Estufa a vácuo, Yamato, modelo ADP-21;
- Forno microonda, Provecto Analítica modelo DGT 100 Plus, com tubos de teflon (100 x 50 mm) com tampa.
- Furadeira, Shulz, modelo FSB, para polimento da coluna;
- Sistema de deionização de água, Milli-Q Plus, Millipore.

3.3. Suporte Cromatográfico

Como suporte cromatográfico foi utilizado a sílica porosa Kromasil, tipo B, forma esférica, tamanho de partícula 5 μm , tamanho de poro de 10 nm, lote 1959.

3.4. Fase Estacionária Líquida

Como fase estacionária líquida foi utilizado o poli(metilfenilsiloxano), 710® fluid, (Figura 11), Sigma-Aldrich, código do produto 37849-6, lote 12908EY. Massa molar média ponderal (\overline{M}_w) de 2432 daltons^c, viscosidade 500 cSt (25 °C) e densidade 1,102 g cm⁻³ (25 °C).

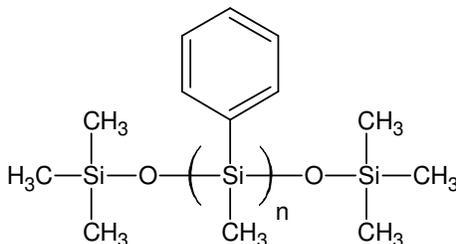


Figura 11. Estrutura molecular do polímero.

^c Esta massa foi obtida através de análise do polímero por cromatografia por permeação em gel.

3.5. Coluna Cromatográfica

As colunas devem ser construídas com materiais resistentes às pressões de enchimento e às usadas nas análises por CLAE e devem ser quimicamente resistentes às fases móveis. A maioria das colunas é construída de aço inox 316 devido à rigidez e força mecânica.

O comprimento da coluna afeta a eficiência e a velocidade de separação. Colunas maiores resultam em tempos de análises mais longos, em contrapartida, a eficiência tende a aumentar. Em geral, colunas curtas são utilizadas para separações mais simples⁵⁶.

O diâmetro interno da coluna influencia na capacidade de aceitação de amostra, na vazão e no alargamento dos picos cromatográficos. Quanto maior o diâmetro, maior a capacidade de aceitação da amostra e maior a vazão a ser utilizada. Entretanto, o alargamento da banda aumenta com o diâmetro interno e a detectabilidade de massa diminui⁵⁶.

Como neste trabalho, houve a necessidade do preparo da fase estacionária inúmeras vezes, adotaram-se colunas com um comprimento menor do que o usual (normalmente de 100 a 250 mm), para reduzir os gastos dos materiais disponíveis (sílica e polímero) e, portanto, diminuir os custos, mas sem afetar o objetivo do estudo realizado.

As colunas utilizadas tinham 60,1 mm de comprimento e 4,1 mm de diâmetro interno e foram confeccionadas na oficina mecânica da UNICAMP, a partir de tubos de aço inoxidável 316, sem costura. Foi necessário realizar o polimento destes tubos, já que eles são adquiridos com uma superfície interna muito irregular⁵⁷. A coluna é acompanhada por acessórios, 2 mangas com filtro, 2 redutores de volume, 2 porcas terminais e 2 tampas de plástico, que são conectados em cada uma das suas extremidades.

Para este trabalho foram confeccionadas 3 colunas cromatográficas, que foram polidas, recheadas com as fases estacionárias, avaliadas cromatograficamente e, após os devidos testes, foram esvaziadas para posterior utilização com outras fases estacionárias.

3.5.1. Polimento das colunas

Para o polimento da superfície interna da coluna, utilizou-se a técnica desenvolvida no LabCrom⁵⁷, que consiste em fixar numa furadeira um fio de aço, de diâmetro menor que o tubo da coluna, envolto com lã de aço e pasta de polimento com partículas abrasivas (FEL-PRO CLOVER, Silicon Carbide Grease Mix, Grit 320 e 180) e passá-lo, inúmeras vezes, em movimento de sobe e desce, pelo tubo. O processo de polimento foi aplicado até se obter, visualmente, uma superfície interna livre de imperfeições. Após o polimento, os tubos foram lavados com detergente e água. Finalmente, as colunas foram deixadas em ácido nítrico 50 % (v/v) por 24 horas e lavados com água e etanol.

3.6. Preparo das Fases Estacionárias

3.6.1. Sorção da fase líquida ao suporte

O método utilizado na preparação das fases estacionárias sorvidas foi o de evaporação do solvente, amplamente empregado em outros trabalhos^{11,34,38,52}. A suspensão da sílica (previamente ativada ou não^d) e a solução do polímero foram preparadas separadamente em diclorometano na proporção de 12 mL para cada grama de material. A solução do polímero foi então agitada, em agitador magnético, por 10 minutos e tanto ela quanto a suspensão de sílica foram sonicadas por mais 10 minutos. Adicionou-se a solução polimérica lentamente à suspensão de sílica e esta mistura foi agitada durante 10 minutos, sonicada por 10 minutos e mantida sob agitação por mais 3 horas. A seguir o frasco foi deixado na capela para evaporação do diclorometano (aproximadamente por 12 horas),

^d A sílica foi previamente ativada somente na obtenção de uma fase estacionária sorvida. Para FE imobilizada em forno de microondas, a etapa da ativação da sílica não foi feita, pois a água sorvida na superfície da sílica pode ajudar na imobilização.

Ativação da sílica: Aquecer a sílica em uma estufa a 150 °C, por 16 horas e logo em seguida deixar a sílica resfriar em um dessecador.

obtendo-se a fase estacionária sorvida. Após a completa evaporação do diclorometano, procedeu-se a imobilização das fases estacionárias.

Para a otimização da porcentagem de carga, foram preparadas fases imobilizadas com cargas de 40 e 50 % (m/m) de PMFS em relação à quantidade total de fase estacionária. Após a otimização, todas as fases foram preparadas com carga de 40 % de PMFS (m/m).

3.6.2. Processo de imobilização do polímero ao suporte cromatográfico

Após a sorção^e do PMFS ao suporte de sílica, o material foi submetido ao processo de imobilização. Esta etapa se faz necessária, pois aumenta a intensidade da interação do polímero com o suporte, evitando a sua lixiviação com a passagem da fase móvel. Para este fim foi usada a radiação microonda. Além disso, fez-se um estudo do tempo de auto-imobilização^f da fase líquida ao suporte de sílica.

3.6.2.1. Auto-imobilização das fases estacionárias

Este estudo teve como objetivo preparar fases estacionárias sem qualquer etapa de imobilização após a sorção do polímero ao suporte. Para tal, um lote maior do material (aproximadamente 5 g) foi preparado e deixado por até 90 dias na capela sendo avaliado periodicamente quanto ao desempenho cromatográfico das FE. Aproximadamente 1 g do material sorvido, quantidade necessária para o enchimento de uma coluna cromatográfica, foi retirado em períodos de 5, 15, 30, 60 e 90 dias.

^e Sorção é a adesão do polímero à superfície da sílica devido à contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e o suporte.

^f FE auto-imobilizadas são aquelas nas quais existem ligações químicas entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida que não foram induzidas por processos externos, como a radiação microonda, mas somente pelo tempo.

3.6.2.2. Radiação Microonda

Porções da fase sorvida foram colocadas em tubos de Teflon e levadas ao forno microonda. A potência e o tempo de radiação, apropriados para obterem fases estacionárias de bom desempenho cromatográfico, foram determinados segundo um planejamento composto central (planejamento fatorial 2^2 + triplicata no ponto central + planejamento estrela). As diferentes condições de imobilização empregadas estão mostradas na Tabela 1.

Para a imobilização, utilizou-se um programa, para o aparelho da Provecto, com os seguintes passos:

Etapa 1: Potência desejada por 10 minutos

Etapa 2: Potência 0 W por 5 minutos

Etapa 3: Potência desejada por 10 minutos

Etapa 4: Potência 0 W por 5 minutos

Etapa 5: Potência desejada por 10 minutos

Tabela 1. Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e potência de radiação microonda para a imobilização das fases Si-PMFS.

Exp. ^a	Valores reais		Tempo Total ^c (min)	Valores codificados	
	Potência (W)	Tempo de Radiação ^b (min)		x ₁	x ₂
1	600	40	55	-1	-1
2	800	40	55	+1	-1
3	600	80	115	-1	+1
4	800	80	115	+1	+1
5	700	60	85	0	0
6	700	60	85	0	0
7	700	60	85	0	0
8	560	60	85	-1,4	0
9	840	60	85	+1,4	0
10	700	32	47	0	-1,4
11	700	88	128	0	+1,4

^a Os experimentos não foram realizados nesta ordem e sim de forma aleatória.

^b Tempo de radiação é o tempo efetivo que a FE recebeu radiação microonda.

^c Tempo total é o tempo de radiação somado com os 5 minutos de P = 0 W, ou seja, é o tempo total que a FE permaneceu no forno microonda.

$$\text{Com: } x_1 = \frac{P - \bar{P}}{\left(\frac{P_+ - P_-}{2}\right)} = \frac{P - 700}{100} \qquad x_2 = \frac{t - \bar{t}}{\left(\frac{t_+ - t_-}{2}\right)} = \frac{t - 60}{20}$$

onde: P = potência e t = tempo

Fizeram-se todos os passos com esta seqüência até completar o tempo desejado de radiação. Por exemplo, para o experimento 1 foram necessários 7 passos para completar os 40 minutos de radiação à uma potência de 600 W, perfazendo 4 etapas de radiação e 3 etapas de resfriamento da amostra. Já para o experimento 3 foram necessários 15 passos para completar os 80 minutos à uma potência de 600 W. O intervalo de 5 minutos sem radiação (0 W de potência) mostrou-se necessário para que ocorresse um melhor acomodamento do polímero na superfície da sílica e para assegurar que não houvesse problemas devido a decomposição do polímero.

As escolhas dos valores de potência e tempo para a construção do planejamento composto central foram baseadas em experimentos anteriores, como será discutido do item 4.2.4 em Resultados em Discussão.

Todos os experimentos, inclusive a triplicata no ponto central (experimentos 5, 6 e 7), foram realizados desde o início do preparo das FE (item 3.6.1), ou seja, a triplicata mede a variação do preparo desde a obtenção da FE e não somente a variação dos resultados devido a imobilização.

Para construção da superfície de resposta foram calculadas às eficiências cromatográficas e os fatores de assimetria para o pico do composto mais retido da mistura teste 2 (acenafteno).

3.6.3. Extração do excesso de polímero

A extração com solvente foi feita para eliminar o excesso de PMFS (polímero não imobilizado na superfície da sílica) das fases estacionárias, que poderia

comprometer a sua eficiência, devido a uma menor velocidade de transferência de massa do soluto entre a FE e a FM.

A extração das fases estacionárias imobilizadas foi realizada utilizando-se uma bomba de alta pressão (tipo recíproca de pistão duplo, Waters modelo 486) e a seguinte seqüência de solventes extratores:

- Clorofórmio por 3 horas;
- Metanol por 2 horas.

Estes solventes foram bombeados, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, através da fase contida em um tubo de aço inox (comprimento 80 mm, diâmetro interno 13 mm)⁵⁸. Escolheu-se o clorofórmio como solvente extrator por solubilizar totalmente o polímero e também baseado nos estudos realizados por Lourenço⁵⁹, que verificou que esta seqüência foi a que apresentou melhores resultados para a extração do polímero, tipo fenil.

Após o período de extração, a fase estacionária foi retirada do reservatório, transferida para um béquer e deixada em capela para evaporação total do solvente.

3.7. Caracterização Físico-Química das Fases Estacionárias

As FE Si-PMFS imobilizadas nas condições otimizadas de radiação microonda, as FE Si-PMFS sorvidas, algumas FE-PMFS imobilizadas em condições diversas e a sílica nua foram caracterizadas físico e quimicamente de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

3.7.1. Porcentagem de carbono

Algumas fases estacionárias preparadas foram submetidas à análise elementar para determinação da quantidade de carbono avaliando-se, desta forma, o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico pelo PMFS. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco para converter os elementos da amostra em gases simples, como CO_2 , H_2O e N_2 . Estes gases são

homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume. Em seguida, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio⁶⁰. As análises foram realizadas em duplicatas, utilizando-se 1 mg de amostra adicionada a 1 mg de mistura oxidante composta de Pb₂O₄ e NaF, na proporção 1:1 (m/m).

Sabendo-se que o PMFS contém 62 % (m/m) de carbono, as porcentagens de carbono obtidas pela análise elementar foram convertidas em porcentagens de PMFS pela equação 9:

$$\%PMFS = \frac{\%C \times 100}{62} \quad (9)$$

Além disso, as porcentagens de carbono também foram convertidas em massa de polímero (m_{PMFS}) por grama do suporte ($m_{suporte}$), denominado de massa específica (\bar{m}_{PMFS}) de acordo com a equação 10:

$$\bar{m}_{PMFS} = \frac{m_{PMFS}}{m_{suporte}} = \frac{\%C}{62 - \%C} \quad (10)$$

Através dos resultados obtidos com a massa específica, pode-se estimar o grau do recobrimento de PMFS no suporte de sílica. Para tal, calculou-se a espessura da camada polimérica (τ) depositada na superfície e nas paredes dos poros do suporte cromatográfico, empregando a equação 11:

$$\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad (11)$$

onde F é a fração de polímero imobilizado e d é o diâmetro médio do poro da sílica. Para tal assume-se que os poros do suporte possuem diâmetros uniformes e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros do suporte.

O valor de F foi determinado a partir da equação 12:

$$F = \frac{\bar{m}_{PMFS\text{imobilizado}}}{\bar{m}_{PMFS\text{poroscheios}}} \quad (12)$$

A massa de PMFS necessária para encher os poros do suporte, $\bar{m}_{PMFS\text{poroscheios}}$, foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica, $V_{p\text{suporte}} = 0,86 \text{ mL g}^{-1}$, e da densidade do PMFS, $\rho = 1,102 \text{ g mL}^{-1}$, conforme apresentado na equação 13:

$$\bar{m}_{PMFS\text{poroscheios}} = V_{p\text{suporte}} \times \rho_{PMFS} \quad (13)$$

Logo, para a sílica, a $\bar{m}_{PMFS\text{poroscheios}}$ é igual a 0,95 g de PMFS por g de suporte.

3.7.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

Estas medidas baseiam-se na adsorção/dessorção de nitrogênio a $-195,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes das medidas, as amostras foram degaseificadas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET⁶¹ a pressões relativas (p/p_o) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_o são, respectivamente, pressão de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a $-195,5 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume total de poro foi determinado empregando o método do ponto único, pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_o de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poro e da área superficial BET ($4 V_p/S_{BET}$).

3.7.3. Cromatografia por exclusão através de permeação em gel

Para a determinação da massa molar do PMFS foi feita a análise cromatográfica por permeação em gel, na qual foi utilizada uma coluna American Polymer Standards Corporation (7,8 x 300 mm), cuja faixa de trabalho é de 1000 a 20000 daltons, fase móvel tetraidrofurano, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detecção das amostras por índice de refração à temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os padrões, de massas molares menores que 1000 daltons, foram diluídos em tetraidrofurano a uma concentração de aproximadamente 0,05 % (m/v). Os padrões com massas

molares maiores que 1000 daltons e a amostra do polímero foram diluídas no mesmo solvente a uma concentração de aproximadamente 0,1 % (m/v).

3.7.4. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das fases estacionárias imobilizadas sobre a sílica foi avaliada empregando análises termogravimétricas. Estas análises foram realizadas em um analisador termogravimétrico, sob atmosfera oxidante, de 25 a 1000 °C, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Os termogramas foram obtidos em porcentagem de perda de massa versus temperatura.

3.7.5. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos na região de 400 a 4000 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto. Os espectros das amostras de sílica e das FE, sorvida e imobilizada, foram obtidos utilizando o acessório de reflectância difusa, enquanto que, para amostras líquidas (PMFS), os espectros foram obtidos a partir de um filme do material sobre uma janela de NaCl.

3.7.6. Ressonância magnética nuclear de carbono 13 e silício 29 (RMN ¹³C e ²⁹Si)

Os espectros de RMN ²⁹Si com CP/MAS (polarização cruzada segundo rotação em ângulo mágico) foram obtidos em um espectrômetro Bruker ASX 300, usando um rotor de zircônia, em velocidade de rotação de 3500 Hz, contendo amostras de 200-250 mg. O tempo de contato foi de 5 ms e o intervalo entre os pulsos de 1,5 s. O alargamento de banda usada foi de 30 Hz e a largura espectral para todos os espectros foi de aproximadamente 25 kHz.

O espectro de RMN ¹³C com CP/MAS foi obtido em um espectrômetro Bruker ASX 400, usando um rotor de zircônia, em velocidade de rotação de 5000 Hz,

contendo amostras de 300 mg. O tempo de contato foi de 3 ms e o intervalo entre os pulsos de 3 s. O alargamento de banda usada foi de 30 Hz e a largura espectral para todos os espectros foi de aproximadamente 25 kHz.

Estas análises foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície da sílica após a imobilização do PMFS.

3.8. Enchimento das Colunas Cromatográficas

3.8.1. Suspensão da fase estacionária

A suspensão da fase estacionária foi preparada em um solvente adequado denominado de solvente de suspensão, o qual possui duas funções: impedir a aglomeração de partículas da fase estacionária e a sedimentação das partículas⁵⁷. Desta forma, o solvente precisa ser criteriosamente escolhido.

Neste trabalho, foi empregado o clorofórmio como solvente de suspensão como uma tentativa de substituição do tetracloreto de carbono, um solvente bastante utilizado nos trabalhos anteriores do LabCrom, mas que possui elevada toxidez^{62,63}.

As suspensões das fases estacionárias utilizadas para fazer o enchimento das colunas foram preparadas em tubos de ensaio com rosca de vedação, utilizando uma concentração de 10 % (m/v) em clorofórmio (0,75 g de FE em 7,5 mL de clorofórmio). As suspensões ficaram em agitação, num agitador roto-torque, por períodos que variaram de 12 a 16 horas.

3.8.2. Recheio das colunas com a fase estacionária

O sistema utilizado para o recheio das colunas está mostrado, esquematicamente, na Figura 12.

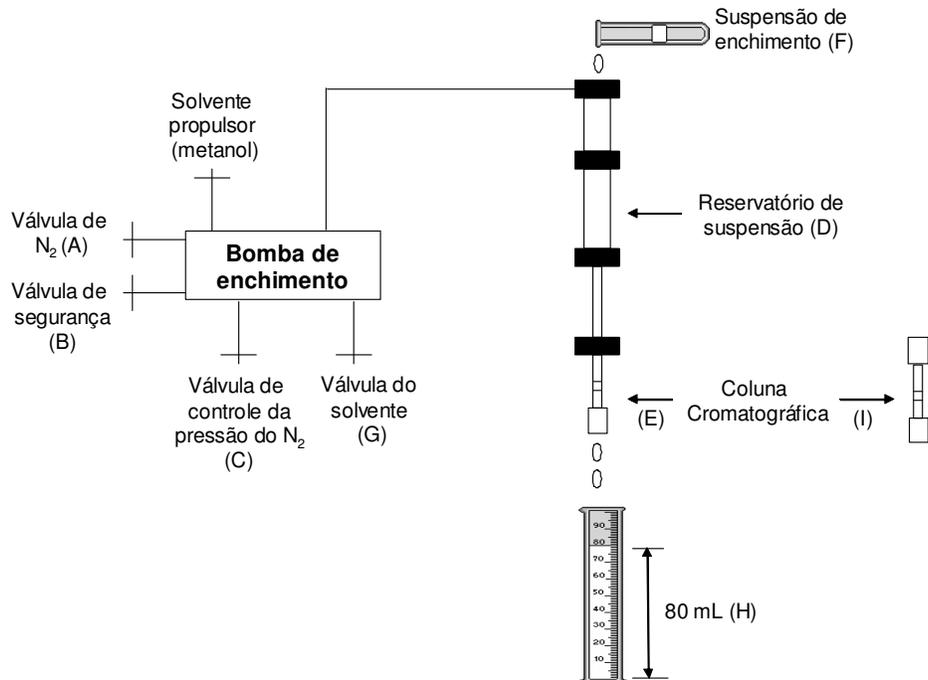


Figura 12. Representação esquemática do sistema de enchimento das colunas.

- Inicialmente, abriam-se as válvulas do cilindro de nitrogênio (A) e de segurança (B);
- Abriu-se a válvula de controle de pressão do gás (C) até obter a pressão desejada de 5000 psi (34,5 MPa). A pressurização foi feita através de uma bomba pneumática da marca Haskel;
- Conectou-se na parte inferior do reservatório de suspensão (D) a coluna (E) que possuía um filtro poroso e as peças terminais em sua extremidade oposta, para evitar a perda da fase estacionária;
- Transferiu-se a suspensão de fase estacionária (F) para o reservatório, completou-se o volume com clorofórmio e imediatamente fechou-se a entrada superior do reservatório;
- Abriu-se a válvula do solvente (G) e deixaram-se passar 80 mL do solvente propulsor (metanol previamente filtrado), que foi recolhido em uma proveta (H) colocada abaixo da saída da coluna;

- Após a passagem destes 80 mL, fechou-se a válvula do solvente e aguardaram-se 20 minutos para compactação do leito da coluna e melhor assentamento da fase estacionária;
- Desconectou-se a coluna do reservatório e na extremidade da coluna que estava ligada ao reservatório, adaptaram-se os seus acessórios (I);
- Fecharam-se, em seqüência, as válvulas de controle de pressão do gás (C), de segurança (B) e a do nitrogênio (A).

Após os devidos testes nas colunas, estas foram esvaziadas neste mesmo sistema. Para isto, a coluna foi acoplada ao reservatório de suspensão, sem nenhum acessório em sua extremidade inferior, para permitir o deslocamento da fase contida no seu interior. O reservatório de suspensão foi completado com metanol, a seguir, fechado e a válvula controladora do solvente propulsor (metanol) foi aberta, deixando-a deste modo até a completa retirada da fase contida na coluna. Após esta etapa, a válvula do metanol foi fechada e a coluna foi retirada e lavada com água e sabão juntamente com seus acessórios. Após a lavagem, todos os acessórios e a coluna foram colocados no ultra-som com metanol por aproximadamente 10 minutos, para permitir a retirada de toda a sílica e para desobstrução dos poros dos filtros.

3.9. Preparo das Fases Móveis

Inicialmente todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram filtrados em uma membrana GV (Durapore), 0,22 μm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica (GVWP04700 – Millipore) para eliminar as impurezas sólidas. Os volumes dos solventes que compõem a fase móvel foram medidos individualmente e a seguir misturados. Após a preparação e também rotineiramente antes da sua utilização, as fases móveis foram desgaseificadas em ultra-som por 30 minutos.

Para os testes realizados, foram preparadas fases móveis com metanol e água nas proporções de 50:50, 60:40 e 70:30 (v/v), podendo ser variada conforme o andamento da pesquisa.

3.10. Condicionamento das Colunas

O condicionamento das colunas após o enchimento é uma etapa necessária para eliminar todos os vestígios dos solventes usados no enchimento e para que se obtenha equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel para se ter repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos eluídos. O condicionamento da coluna após o enchimento foi feito sem acoplá-la ao detector, para evitar que partículas provenientes da coluna pudessem obstruir a tubulação de entrada ou a saída do detector ou, principalmente, a cela de detecção.

No condicionamento das colunas foram utilizadas as fases móveis na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, durante 2 horas⁶⁴.

3.11. Avaliação Cromatográfica das Fases Estacionárias

A avaliação cromatográfica das fases estacionárias foi feita através do cálculo dos parâmetros cromatográficos dos compostos eluídos de misturas testes sintéticas.

Os cálculos dos parâmetros cromatográficos foram obtidos através do software "Report Write Plus" inserido no software de tratamento de dados "Chrom Perfect". Foram feitos cálculos de N/m (número de pratos por metro de coluna), As_{10} (fator de assimetria a 10 %), R_s (resolução) e k (fator de retenção) de todos os componentes da mistura teste. As avaliações de cada coluna foram feitas em triplicata.

Todas as análises foram realizadas utilizando o detector UV-Visível, no comprimento de onda de 254 nm. O volume de amostra injetado foi sempre de 5 μL . Inicialmente, a vazão utilizada foi de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e foi definida com base em outros estudos desenvolvidos no LabCrom^{11,34,38,52}. Após a escolha da melhor composição da fase móvel, foi construída a curva de van Deemter, para a determinação da vazão ótima.

3.11.1. Misturas testes usadas para a avaliação cromatográfica

Para a avaliação das colunas, foram utilizadas várias misturas testes que estão descritas a seguir com as respectivas fases móveis.

- **Misturas testes 1 e 2**

Para a avaliação cromatográfica de todas as colunas, foram utilizadas duas misturas testes, que são:

- Mistura Teste 1 (MT 1): uracila (1 mg L^{-1}), benzonitrila (30 mg L^{-1}), benzeno (30 mg L^{-1}), tolueno (30 mg L^{-1}) e naftaleno (30 mg L^{-1}).
- Mistura Teste 2 (MT 2): uracila (1 mg L^{-1}), fenol (20 mg L^{-1}), N,N-dimetilanilina (20 mg L^{-1}), naftaleno (30 mg L^{-1}) e acenafteno (50 mg L^{-1}).

O composto uracila foi utilizado como composto não retido para a obtenção do valor de t_M , necessário para os cálculos do parâmetro cromatográfico “fator de retenção”.

A mistura 1 foi utilizada para avaliar a seletividade e hidrofobicidade das FE na separação de compostos neutros de polaridades diferentes: polares (benzonitrila) e apolares (benzeno, tolueno e naftaleno).

A mistura 2 foi utilizada para avaliar o comportamento da fase diante de compostos de caráter ácido (fenol), básico (N,N-dimetilanilina), neutros e hidrofóbicos (naftaleno e acenafteno).

As duas misturas foram preparadas qualitativamente em fase móvel metanol:água nas proporções 50:50, 60:40 ou 70:30 (v/v).

- **Mistura teste de Engelhardt e Jungheim**

Para a caracterização das fases estacionárias preparadas foi usada a mistura teste de Engelhardt e Jungheim⁶⁵. A mistura é composta por uracila (1 mg L^{-1}), anilina (15 mg L^{-1}), fenol (20 mg L^{-1}), N,N-dimetilanilina (20 mg L^{-1}), tolueno (30 mg L^{-1}) e etilbenzeno (30 mg L^{-1}). Foi empregada uma fase móvel metanol:água, 55:45 (v/v) a uma vazão ótima de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura ambiente e detecção a 254 nm.

A mistura teste de Engelhardt e Jungheim foi utilizada para obterem as seguintes informações:

- *Seletividade hidrofóbica* – Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH_2} = k_{etilbenzeno} / k_{tolueno}$), que diferem entre si por um grupo CH_2 , também denominada de seletividade metilênica. O valor de α_{CH_2} fornece informações a respeito da hidrofobicidade das FE.
- *Atividade silanofílica* – Medida pelo fator de assimetria do pico da N,N-dimetilanilina a 10 % de sua altura e também pela ordem de eluição dos compostos básicos (anilina e N,N-dimetilanilina). Engelhardt e Jungheim em seus estudos⁶⁵ notaram que FE com baixa atividade silanofílica (consideradas por eles de boa qualidade) apresentavam certos comportamentos bem semelhantes, tais como: a anilina sempre elui antes do fenol (em alguns casos pode haver a co-eluição destes dois compostos), a N,N-dimetilanilina sempre é eluída antes do tolueno e a razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol sempre é inferior a 1,3.

- **Mistura teste de Tanaka**

No teste de Tanaka⁶⁶, quatro misturas testes foram empregadas, sendo que cada uma possui uma composição de fase móvel específica. Todas as misturas foram analisadas a temperatura ambiente, empregando uma vazão ótima de fase móvel de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção a 254 nm. As misturas e suas respectivas fases móveis são:

- Mistura A: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, o-terfenila e trifenileno.
FM: metanol:água, 80:20 (v/v).
- Mistura B: uracila, cafeína e fenol.
FM: metanol:água, 30:70 (v/v).
- Mistura C: uracila, benzilamina e fenol.
FM: metanol:20 mmol L^{-1} de K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,6, 30:70 (v/v).
- Mistura D: uracila, benzilamina e fenol.
FM: metanol:20 mmol L^{-1} de KH_2PO_4/H_3PO_4 pH 2,7, 30:70 (v/v).

No teste de Tanaka, as propriedades das FE avaliadas foram:

- *Hidrofobicidade ou seletividade hidrofóbica (α_{CH_2})* – Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB} / k_{BB}$. Esta é uma medida do recobrimento superficial da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH_2 , é dependente da quantidade de polímero imobilizado.
- *Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$)* – Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da o-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T / k_O$. O $\alpha_{T/O}$ é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.
- *Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$)* – Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/F} = k_C / k_F$. O $\alpha_{C/F}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra.
- *Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6)* – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 = k_B / k_F . O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da FE.
- *Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7)* – Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 2,7 = k_B / k_F . O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.

- **Misturas testes de Szabó et al.**

As misturas testes de Szabó et al. com as respectivas fases móveis empregadas foram:

- Uracila, fenol, tolueno, m-cresol, acetofenona, benzoato de metila, p-xileno e propilbenzeno.
FM: metanol:água, 60:40 (v/v).
- Uracila, benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno e butilbenzeno.
FM: metanol:água, 70:30 (v/v).

A primeira mistura teste foi utilizada para comparar os resultados obtidos na separação dos compostos com a FE Si-PMFS imobilizada nas condições otimizadas de radiação microonda com uma FE de Szabó et al.⁴⁵ preparada a partir de fenilmetilpolissiloxano quimicamente ligado a superfície da sílica. Já a segunda mistura foi utilizada somente para verificar o potencial de separação dos compostos aromáticos.

3.12. Avaliação da Aplicabilidade das Fases Estacionárias

A aplicabilidade das fases estacionárias foi avaliada na separação de compostos com características ácidas ou básicas ou neutras, tais como agrotóxicos. As misturas não foram preparadas quantitativamente, e sim de forma que os compostos tivessem uma concentração suficiente para que os seus picos nos cromatogramas possuíssem uma altura razoável e semelhante entre si.

3.12.1. Separação de agrotóxicos

A fase estacionária obtida nas melhores condições de imobilização foi utilizada na separação dos seguintes agrotóxicos: imazaquim, cianazina, atrazina, diurom e linurom, cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 13. Para a separação foi utilizado uma fase móvel metanol:água, 50:50 (v/v), com vazão de 0,3 mL min⁻¹, temperatura ambiente e detecção a 220 nm.

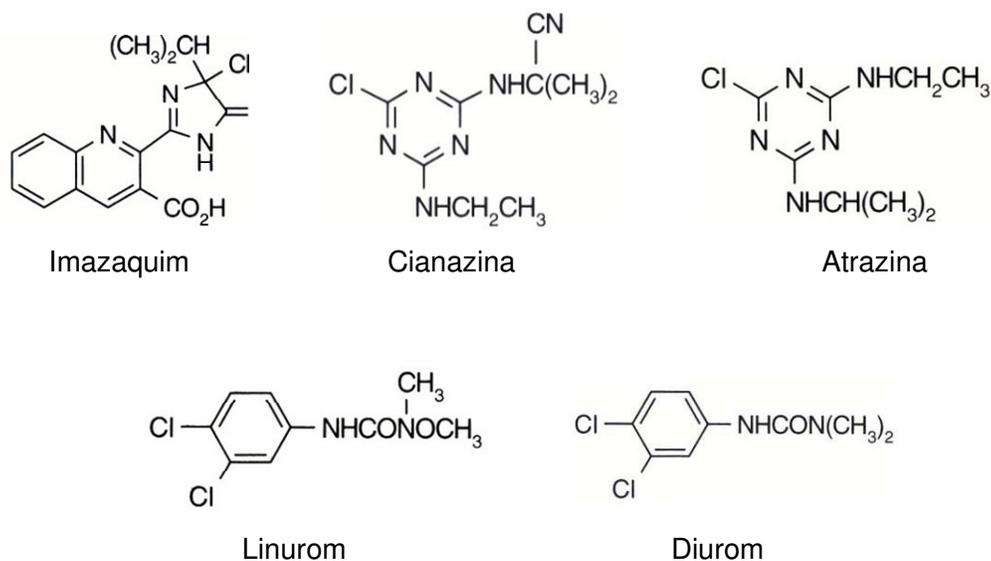


Figura 13. Estrutura química dos agrotóxicos estudados.

3.13. Teste de Estabilidade

O teste de estabilidade química da fase Si-PMFS foi realizado através da passagem de uma fase móvel alcalina, metanol:NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹ + NaOH pH 9,0, 50:50 (v/v), pela coluna cromatográfica seguida da avaliação periódica dos parâmetros cromatográficos (eficiência e fator de assimetria) obtidos após a injeção da mistura teste 2. Antes de cada avaliação, as colunas foram condicionadas por 10 minutos com a mesma fase móvel utilizada na análise da mistura, na vazão 0,3 mL min⁻¹, após estes 10 minutos de condicionamento a MT2 foi injetada e avaliada a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ e à temperatura de 40 °C.

A estabilidade química da FE foi determinada em função do número de volume de colunas que corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços dentro da coluna com o recheio cromatográfico, ou seja, o volume que não é ocupado pelo recheio – volume de coluna cheia (V_{col}). O volume de coluna foi calculado a partir do t_M (t_R da uracila) e da vazão da fase móvel (F), conforme a Equação 10:

$$V_{col} = F \times t_M \quad (14)$$

O valor V_{col} calculado foi igual a 0,58 mL de fase móvel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão discutidos primeiramente os resultados das análises termogravimétricas obtidos para a sílica e para o PMFS, pois estas análises foram as primeiras a serem feitas devido a importância de se conhecer a estabilidade destes dois materiais em temperaturas mais altas.

4.1. Análise Termogravimétrica

A termogravimetria (TG) faz parte de um conjunto de ferramentas importantes utilizadas para a caracterização de materiais e é especialmente útil para a determinação de constituintes voláteis em sólidos. Na análise termogravimétrica, a massa da amostra é continuamente monitorada, enquanto a temperatura é aumentada a uma razão constante. A perda de massa ocorre quando compostos voláteis adsorvidos são eliminados e, também a temperaturas mais altas, quando ocorre a degradação da amostra com formação de produtos voláteis⁶⁷.

Observa-se no termograma A da Figura 14 que o polímero é estável até 200 °C em atmosfera oxidante. Dessa maneira, ele pode ser utilizado em imobilizações em temperaturas de até 200 °C, sem sofrer degradação.

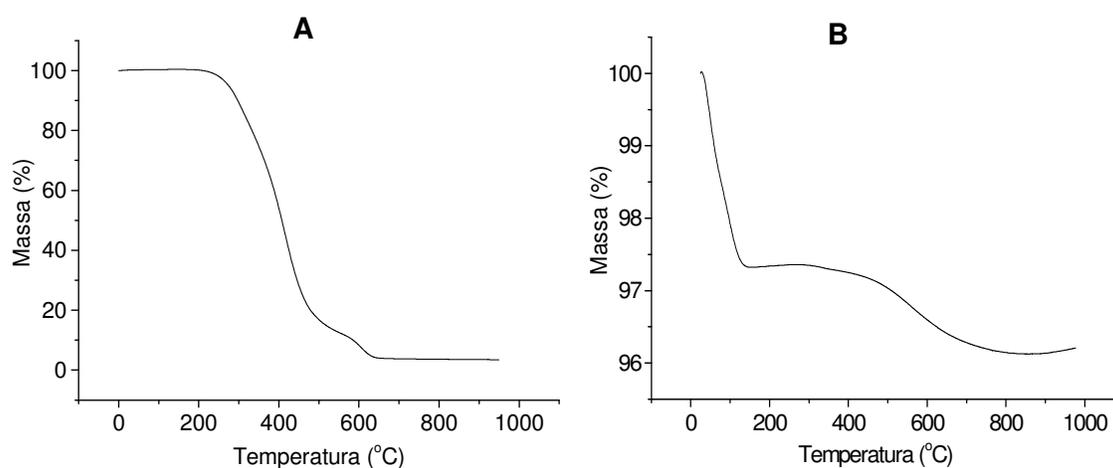


Figura 14. Termogramas (A) do PMFS e (B) da sílica nua em atmosfera oxidante.

No termograma B da Figura 14, referente à sílica, pode-se observar a perda das camadas mais externas de água adsorvida fracamente até 120 °C. A partir de 250 °C, inicia-se a perda da primeira camada de água, fortemente adsorvida por ligações de hidrogênio. Nessas duas etapas, a perda de água é reversível. A partir de 400 °C, os grupos silanóis perdem água e produzem ligações tipo siloxano, sendo que esta perda é irreversível, a partir de 600 °C.

4.2. Preparo das Fases Estacionárias

4.2.1. Estudo da Sorção do PMFS Sobre Sílica

Para avaliar o período de sorção⁹ do PMFS sobre a superfície da sílica preparou-se um lote maior de PMFS sorvido em partículas de sílica ativada e avaliou-a periodicamente por um tempo de 90 dias, quanto ao comportamento cromatográfico. Todas as fases foram submetidas à etapa de extração, após os períodos determinados de sorção, para avaliar a quantidade efetiva de PMFS que ficou aderida (sorvida) ao suporte de sílica. O grau de recobrimento (porcentagem de carbono) e o desempenho cromatográfico das fases Si-PMFS sorvidas foram avaliados pela mistura teste 1 e por análise elementar. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 15.

Através dos cromatogramas, verificou-se que mesmo após um período longo de sorção não houve uma separação adequada dos compostos da mistura teste 1, provavelmente o período necessário para auto-imobilização^h deve ser maior que o avaliado. Além disso, a análise elementar da fase Si-PMFS sorvida por 90 dias mostrou que há somente 3,6 % de carbono, indicando que há uma baixa retenção do polímero na superfície da sílica. Uma possível explicação para este fato é a alta viscosidade do polímero estudado (500 cSt a 25 °C) que não permite o preenchimento adequado dos poros da sílica, quando comparado aos outros

⁹ Adesão do polímero à superfície da sílica devido à contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e o suporte³⁴.

^h São fases nas quais existem ligações químicas entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, não induzidas por processos externos³⁸.

polímeros empregados pelo nosso grupo, cuja viscosidade está em torno de 100 a 300 cSt. Lourenço⁵⁹ utilizou um copolímero também do tipo fenil, o dimetil-metil-fenil-siloxano, que possui uma viscosidade de 125 cSt, e obteve fases estacionárias sorvidas por 6 dias com boa resolução e eficiência de até 80.000 pratos m^{-1} para o naftaleno.

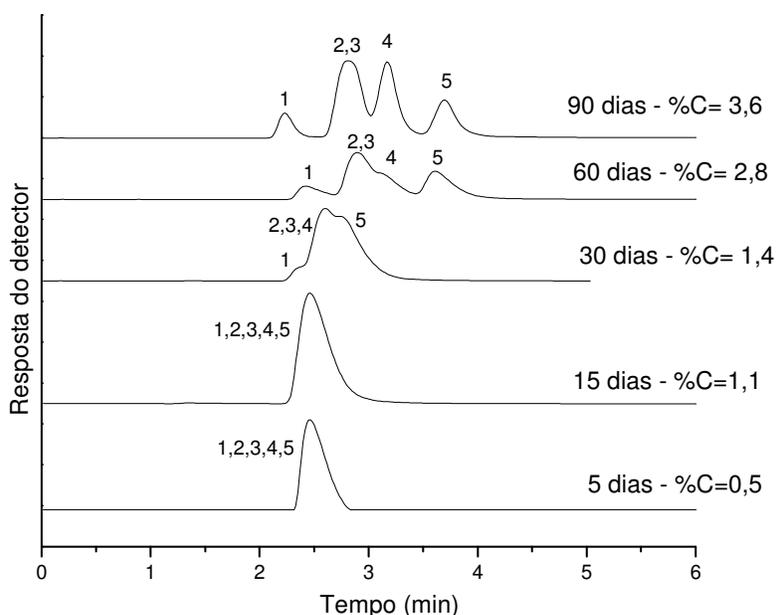


Figura 15. Cromatogramas obtidos com as fases Si-PMFS sorvidas por diferentes períodos e suas porcentagens de carbono. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 $mL\ min^{-1}$; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Como um período muito longo de auto-imobilização não é desejado, decidiu-se interromper o estudo da sorção em 90 dias e realizar a imobilização da FE logo após a evaporação total do diclorometano (solvente usado no preparo da FE) que é de aproximadamente um dia.

4.2.2. Determinação das Condições Cromatográficas Ótimas Para Avaliação das Fases Estacionárias

No início do desenvolvimento da pesquisa, vários testes preliminares foram realizados, nos quais a potência (400 à 700 W) e o tempo (40 à 70 minutos) de radiação microonda foram variados com o objetivo de obter uma coluna cromatográfica com boa eficiência e resolução. A melhor condição de radiação encontrada foi 700 W por 70 minutos. Utilizando a coluna recheada com esta fase estacionária fizeram-se estudos da composição ideal e da vazão ótima da fase móvel.

As percentagens do componente orgânico na fase móvel adequada para o estudo das fases estacionárias foram determinadas avaliando-se a Mistura Teste 1 (MT1). Fases móveis de metanol:água com composições de 50:50, 60:40 e 70:30 (v/v) foram empregadas com a fase estacionária de Si-PMFS (carga de PMFS igual a 50 % m/m) imobilizada por radiação microonda a 700 W por 70 minutos, deixadas em repouso por mais de 24 horas (este tempo de repouso mostrou-se necessário como será explicado logo a baixo) para então fazer a extração do excesso de polímero. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 16.

Pode-se observar por estes cromatogramas que tanto a fase móvel de composição metanol:água 60:40 (v/v) como a 70:30 (v/v) foram boas, pois nestas composições tem-se um tempo adequado de análise e uma boa separação dos compostos. A composição para a fase móvel 50:50 (v/v), resultou um fator de retenção de 13,3 para o naftaleno e um tempo longo de análise, com picos alargados. Optou-se pela composição metanol:água 60:40 (v/v) por ter fornecido uma separação ligeiramente superior para os pares benzeno/benzonitrila e benzonitrila/tolueno.

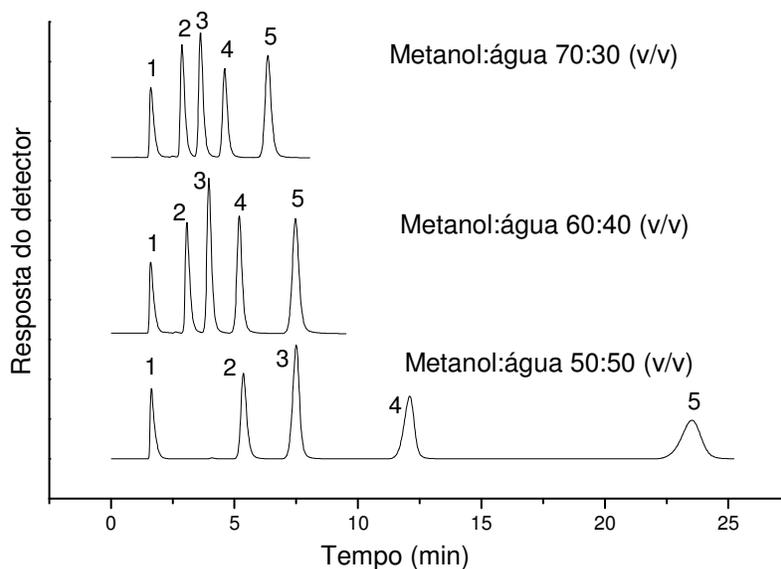


Figura 16. Cromatogramas obtidos na seleção da composição da fase móvel para a avaliação das fases de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; vazão: 0,4 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5) naftaleno.

No decorrer da pesquisa observou-se que foi necessário um tempo de repouso da FE após a imobilização por radiação microonda para então fazer a extração do excesso de polímero. Este repouso mostrou-se necessário para ocorrer a imobilização do polímero, pois as FE que sofreram a extração logo após a imobilização (Figura 17 A) não apresentaram uma retenção eficiente do polímero, sendo que a porcentagem de carbono obtida foi de apenas 3,8 % e, conseqüentemente não houve separação dos compostos analisados. Na Figura 17 B pode-se observar a melhora na resolução dos compostos com uma FE Si-PMFS que permaneceu em repouso por mais de 24 horas após a imobilização para então ser submetida à extração do excesso de polímero. A porcentagem de carbono nesta FE foi de 11,7 %.

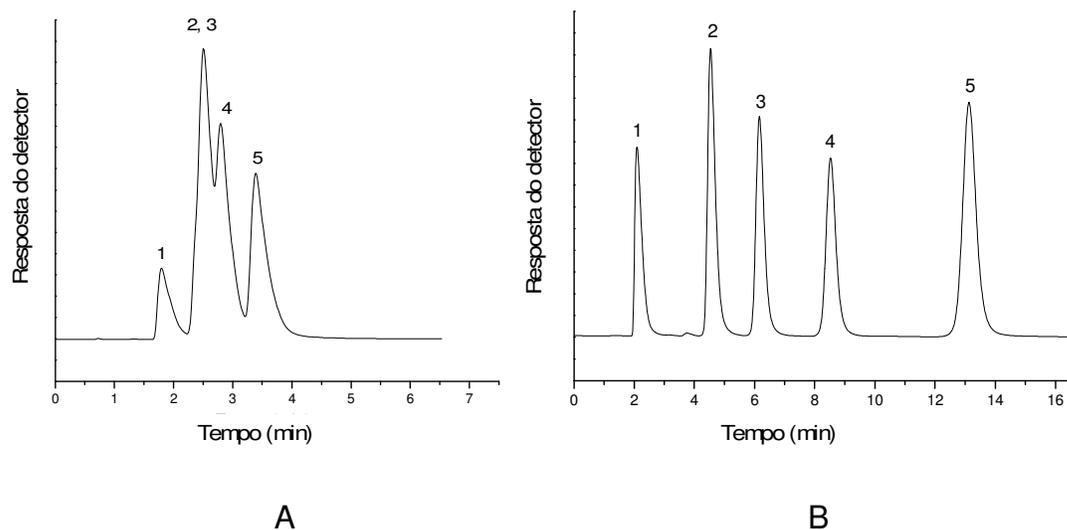


Figura 17. Cromatogramas obtidos na separação de duas FE Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda a 700 W por 70 minutos extraídas com clorofórmio e metanol (A) logo após a imobilização e (B) após 24 horas da imobilização. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5) naftaleno.

A vazão ótima da fase móvel metanol:água 60:40 (v/v) foi definida com base na curva de van Deemter, que relaciona os valores da altura de um prato (H) à velocidade linear da fase móvel (μ).

A Figura 18 mostra a curva de van Deemter obtida com a FE Si-PMFS. Observa-se que o ponto mínimo da curva, com H equivalente a 0,9 μm (eficiência de coluna de 67000 pratos m^{-1} para o naftaleno) foi obtido com uma vazão de 0,2 mL min^{-1} ($\mu \cong 2,1 \text{ cm min}^{-1}$). Porém, foi adotado a vazão de fase móvel igual a 0,3 mL min^{-1} por resultar em tempos de análises mais rápidos e boa eficiência (65417 pratos m^{-1}). Pode-se notar que a eficiência obtida com a vazão 0,2 mL min^{-1} não é muito superior à obtida com a vazão 0,3 mL min^{-1} (a diferença é de apenas 2,4 %).

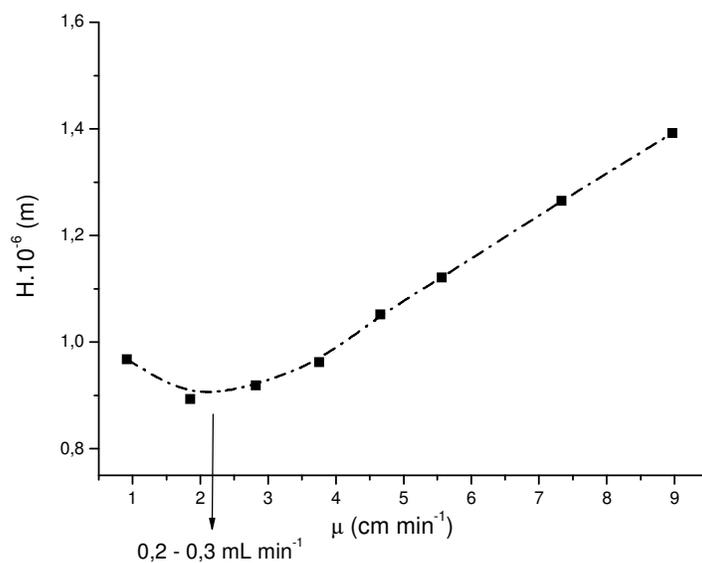


Figura 18. Curva de van Deemter para uma fase estacionária de Si-PMFS imobilizada por radiação microonda.

4.2.3. Avaliação da Carga do Polímero

Para verificar qual a melhor carga de PMFS, prepararam-se FE com cargas de 40 e 50 % (m/m)¹¹, que foram imobilizadas por radiação microonda a uma potência de 700 W por 70 minutos, deixadas em repouso por mais de 24 horas para então fazer a extração do excesso de polímero.

Na Tabela 2 encontram-se os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para o naftaleno, juntamente com a porcentagem de PMFS e espessuras das camadas poliméricas.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos, porcentagem de PMFS e espessura da camada polimérica (τ) obtidas na avaliação da influência da carga do polímero, usando fase móvel metanol:água 60:40 (v/v) e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹.

Carga (%)	t_R (min)*	k^*	As^*	N (pratos m ⁻¹)*	% PMFS	τ (nm)
40	13,09	4,9	1,2	64139	20	0,82
50	11,31	4,3	1,1	64457	19	0,75

* Calculados para o naftaleno

Pelos resultados obtidos nota-se que há uma pequena diferença entre os resultados das análises cromatográficas utilizando diferentes cargas de polímero, porém esta diferença foi atribuída a erros aleatórios e não a carga de polímeros. Portanto, conclui-se que 40 % de carga de PMFS é uma quantidade suficiente para que haja um bom recobrimento da superfície da sílica, além de implicar em um menor consumo do polímero.

4.2.4. Avaliação Cromatográfica dos Procedimentos de Imobilização do PMFS Sobre a Sílica

Todas as fases estacionárias foram preparadas a partir de uma carga de PMFS de 40 % (m/m). Após o preparo das fases estacionárias e a total evaporação do diclorometano, aproximadamente um dia, estas foram submetidas à imobilização por radiação microonda, empregando o planejamento composto central. A potência e o tempo de radiação foram as variáveis estudadas neste trabalho. O domínio experimental (potência e tempo de radiação) e os valores médios de 700 W e 60 minutos foram definidos de acordo com trabalhos anteriores^{38,52} e com experimentos prévios realizados.

As fases de Si-PMFS foram submetidas à etapa de imobilização por radiação microonda de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 1. Após a etapa de imobilização, todas as fases foram deixadas em repouso por seis diasⁱ e então submetidas à etapa de extração para a remoção do PMFS não imobilizado sobre a sílica. A porcentagem de PMFS, a espessura da camada polimérica e os parâmetros cromatográficos das fases de Si-PMFS para o acenafteno (composto neutro) e N,N-dimetilanilina (composto básico) estão apresentados na Tabela 3.

ⁱ Este tempo de repouso foi adotado devido somente por questões práticas, já que um tempo de repouso de 24 horas produz os mesmos efeitos que 6 dias.

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos das fases Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda para o acenafteno e N,N-dimetilanilina e as suas respectivas porcentagens de PMFS e espessura da camada polimérica (τ).

Experimento/ Potência/Tempo	Parâmetros Cromatográficos				%PMFS	τ (nm)
	N (pratos m ⁻¹) ^a	k ^a	Rs ^b	As ^c		
1 (600W/40min)	52302	8,9	8,6	1,6	16,9	0,64
2 (800W/40min)	34548	5,4	5,8	2,7	15,2	0,56
3 (600W/80min)	61989	9,4	9,6	1,4	19,5	0,77
4 (800W/80min)	62109	10,6	9,8	1,7	21,8	0,89
5 (700W/60min)	66140	8,7	9,6	1,2	19,8	0,78
6 (700W/60min)	74453	8,4	10,1	1,5	18,5	0,72
7 (700W/60min)	77934	11,3	11,1	1,5	22,1	0,91
8 (560W/60min)	33304	6,0	5,9	2,3	16,8	0,63
9 (840W/60min)	49907	6,6	7,4	1,9	17,3	0,65
10 (700W/32min)	23684	3,8	4,1	2,2	13,2	0,47
11 (700W/88min)	70346	9,8	10,2	1,6	19,8	0,79

^a Calculado para o pico do acenafteno.

^b Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

^c Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina.

A repetibilidade do preparo das FE e do enchimento das colunas cromatográficas foi verificada pela realização dos experimentos em triplicata no ponto central do planejamento experimental (exp. 5, 6 e 7). A estimativa do desvio padrão relativo (RSD) foi inferior a 5 % para a eficiência da coluna, medida para o pico do acenafteno, e de 9 % para a percentagem de PMFS. Estes resultados são considerados bons levando-se em consideração as inúmeras variáveis envolvidas no processo, tanto no preparo das FE quanto no enchimento das colunas cromatográficas.

Observa-se pela Tabela 3 que quando se empregam potências elevadas (experimentos 2, 4 e 9) ou baixas (experimentos 1, 3 e 8) a eficiência da coluna é relativamente baixa quando comparada com as eficiências obtidas a uma potência de 700 W. Tempos muito abaixo ou muito acima de 60 minutos, também não propiciam colunas com boa eficiência. As piores colunas foram obtidas nos experimentos 2 (800W/40min), 8 (560W/60min) e 10 (700W/32min), indicando que quando se usa um tempo curto de radiação ou potências baixas, não ocorre imobilização efetiva. Este fato é confirmado pelas espessuras de camadas poliméricas destas FE, que são as mais baixas, o que indica que não houve um

recobrimento completo da superfície da sílica pelo polímero. Os experimentos 9 (840W/60min) e 1 (600W/40min), cujas espessuras de camadas poliméricas estão em torno de 0,65, também não apresentaram resultados satisfatórios. No ponto central, experimentos 5, 6 e 7, percebe-se que além de bons resultados para o acenafteno, o composto básico N,N-dimetilanilina, apresenta um fator de assimetria entre 1,2 a 1,6, resultado considerado bom para as fases estacionárias preparadas no LabCrom. Finalmente, o experimento 11 também apresentou bons resultados de eficiência, reforçando que potências próximas de 700 W e tempos maiores são as condições mais propícias para a imobilização por microonda.

Após a avaliação de todas as fases de Si-PMFS nas diferentes condições de imobilização, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada com base no planejamento composto central, para determinar a condição ótima de imobilização. A metodologia de superfície de resposta foi baseada nos valores de eficiência da coluna e de fator de assimetria, ambos para o pico do acenafteno.

Para a obtenção das superfícies de respostas foi ajustado um modelo quadrático para cada uma das respostas otimizadas. As equações que explicam as variações ocorridas na execução do experimento junto com seus desvios padrões, estão apresentadas abaixo:

$$N \text{ (pratos m}^{-1}\text{)} = 72842 + 730x_1 + 12905x_2 - 13512x_1^2 - 10807x_2^2 + 4469x_1x_2$$

$$(\pm 3499) \quad (\pm 2142) \quad (\pm 2142) \quad (\pm 2550) \quad (\pm 2550) \quad (\pm 3029)$$

$$As_{10\%} = 0,99 - 0,001x_1 - 0,34x_2 + 0,24x_1^2 + 0,20x_2^2 - 0,17x_1x_2$$

$$(\pm 0,09) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,06) \quad (\pm 0,07) \quad (\pm 0,07) \quad (\pm 0,08)$$

De acordo com as duas equações e com o gráfico de Pareto (Figura 19), pode-se afirmar, com 95 % de confiança, que somente o efeito principal x_2 (tempo) é significativo no intervalo estudado, ou seja, o efeito existe mesmo. O efeito principal x_1 (potência) e o efeito de interação x_1x_2 (tempo/potência), nas duas equações, possuem intervalos de confiança que passam pelo zero com 95 % de confiança, ou seja, estes efeitos podem ser iguais a zero. Como somente o efeito tempo é significativo, pode-se dizer que este é o principal efeito que influencia na

eficiência e no fator de assimetria das fases Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda.

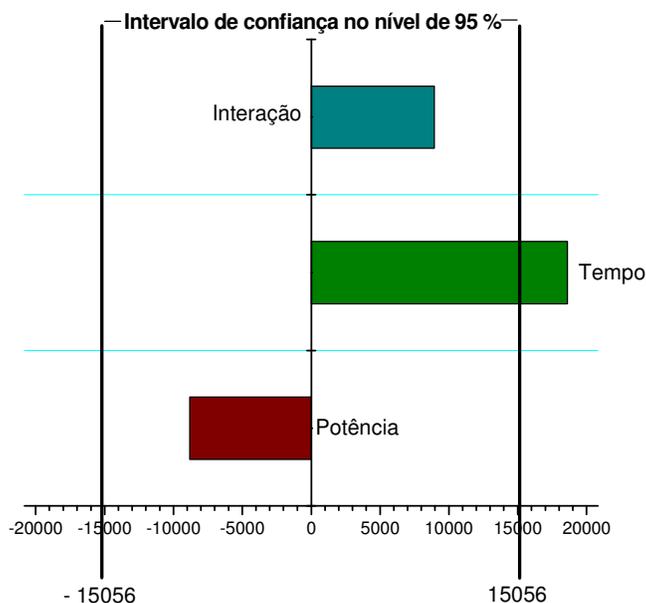


Figura 19. Efeito das variáveis estudadas e de sua interação, na eficiência de coluna das fases estacionárias Si-PMFS imobilizada por radiação microonda.

A validade das equações ajustadas para as eficiências de coluna e fatores de assimetria obtidos para as fases Si-PMFS foi avaliada pela análise da variância (ANOVA). Os dados da ANOVA para as eficiências de coluna e fator de assimetria para o pico do acenafteno estão dispostos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às eficiências da coluna para o pico do acenafteno.

Fonte de Variação (FV)	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$2,73 \times 10^9$	5	$5,47 \times 10^8$
Resíduos	$5,30 \times 10^8$	5	$1,06 \times 10^8$
Falta de ajuste	$4,56 \times 10^8$	3	$1,52 \times 10^8$
Erro Puro	$7,34 \times 10^7$	2	$3,67 \times 10^7$
Total	$3,26 \times 10^9$	10	

% de Variação Explicada: 87,77
% Máxima de Variação Explicável: 97,75
 $MQ_{faj}/MQ_{ep} = 4,14$

Tabela 5. Análise da variância do modelo quadrático ajustado aos fatores de assimetria para o pico do acenafteno.

Fonte de Variação (FV)	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	1,4508	5	0,2902
Resíduos	0,9966	5	0,1993
Falta de ajuste	0,9482	3	0,3161
Erro Puro	0,0485	2	0,0242
Total	2,4475	10	
% de Variação Explicada: 59,28			
% Máxima de Variação Explicável: 98,02			
$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 13,04$			

De acordo com a ANOVA, os modelos quadráticos aplicados tanto para o dado de eficiência como de fator de assimetria não apresentaram falta de ajustes, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental (MQ_{faj}/MQ_{ep}) foram menores que o valor tabelado de $F_{3,2}$ (no nível de 95 %) ⁵⁴, que é de 19,16. Isto implica que o modelo ajustado aos dados de eficiências e fatores de assimetria explica, de forma satisfatória, as variações ocorridas nos resultados. Conforme as Tabelas 4 e 5, 88 % e 60 %, respectivamente, das variações ocorridas nas respostas são explicadas pelo modelo.

As superfícies de respostas obtidas estão apresentadas nas Figuras 20 e 21. Para a superfície de respostas baseada na eficiência foi escolhida a região de máximo e quando baseada no fator de assimetria foi delimitada uma região na qual os valores se concentravam próximos a 1,0. As regiões vermelhas e verdes nas superfícies e nas curvas de nível indicam, respectivamente, maior e menor eficiência de coluna (Figura 20) e, maior fator de assimetria e simetria ótima (Figura 21) para os picos de acenafteno nas fases de Si-PMFS imobilizadas por radiação microonda.

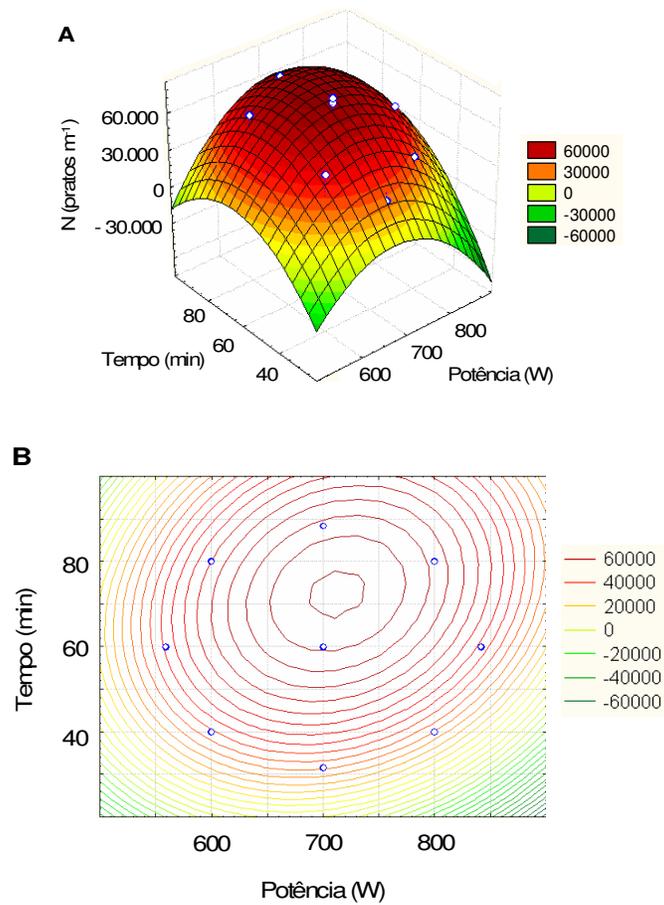


Figura 20. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) baseada na eficiência de coluna para o acenafteno.

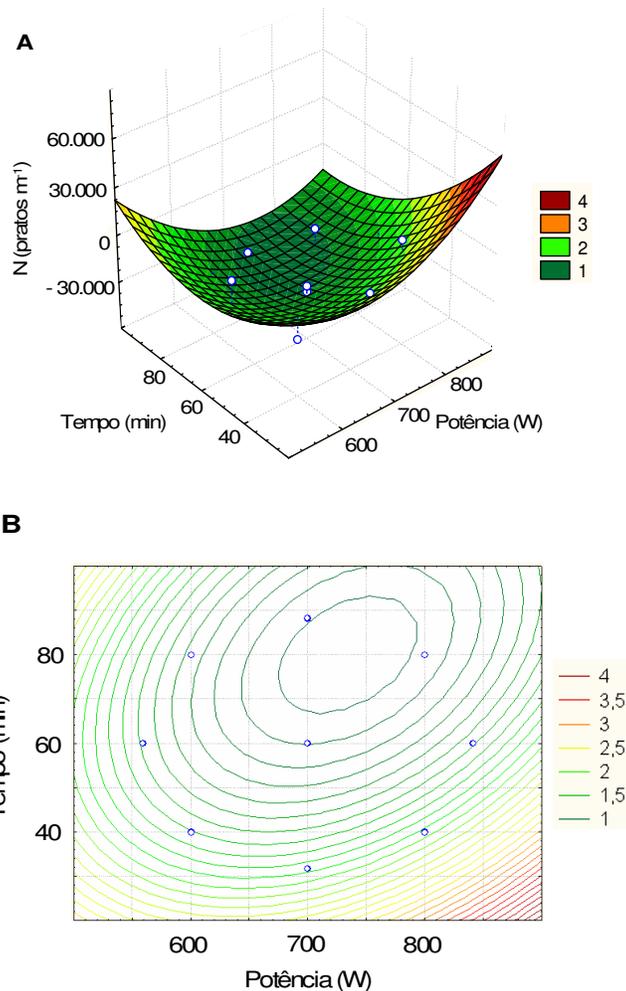


Figura 21. Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) baseada no fator de assimetria de coluna para o acenafteno.

Através das superfícies de respostas e curvas de níveis, pode-se verificar que a condição ótima de imobilização por radiação microonda para uma melhor eficiência da coluna está delimitada na região de 690 – 740 W e 68 – 78 minutos. Já para o fator de assimetria, a região ótima está em torno de 680 – 750 W e 65 a 92 minutos. Para que haja boas respostas de eficiência e de fator de assimetria foi escolhida a condição em que estas duas respostas fossem beneficiadas, deste modo, escolheu-se a condição de 720 W de potência por 70 minutos de radiação.

Na Figura 22 podem ser visualizados os cromatogramas de separação das misturas MT 1 e MT 2 obtidos com uma coluna cromatográfica com fase Si-PMFS

imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos. Na Tabela 6, estão mostrados os parâmetros cromatográficos dos compostos mais retidos da MT 1 e MT 2 e da N,N-dimetilanilina.

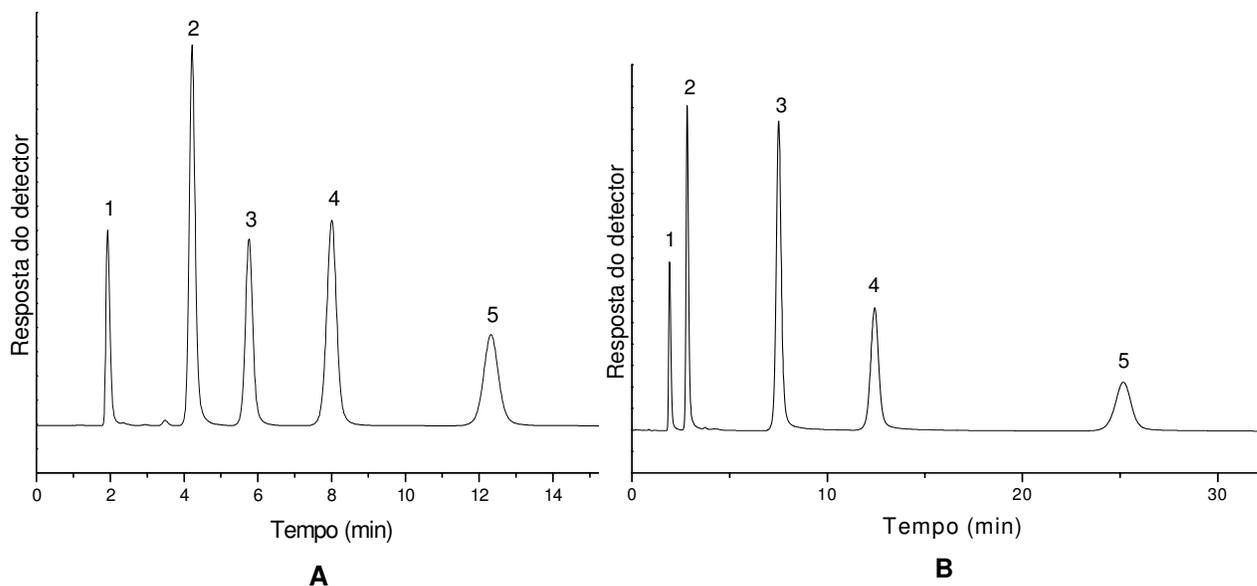


Figura 22. Cromatogramas mostrando a separação da MT 1 (A) e MT 2 (B) empregando a fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos analisados: A) MT 1 - (1) uracila, (2) benzeno, (3) benzonitrila, (4) tolueno e (5) naftaleno. B) MT 2 - (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos de alguns compostos da MT 1 e MT 2 obtidos em uma coluna recheada com a fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos.

Compostos	Parâmetros Cromatográficos			
	N (pratos m^{-1})	As _{10%}	k	Rs
Naftaleno	72159	1,1	5,4	7,1 ^a
Acenafteno	70973	0,9	12,1	11,0 ^b
N,N-dimetilanilina	66195	1,2	2,9	10,1 ^c

^a Calculado para o par tolueno-naftaleno.

^b Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

^c Calculado para o par fenol-N,N-dimetilanilina.

Através da Tabela 6 e da Figura 22 observa-se que há uma boa eficiência para os compostos analisados e que, além do naftaleno e do acenafteno possuem

boa simetria, o composto básico presente na mistura teste 2, N,N-dimetilanilina, apresenta um fator de assimetria considerado muito bom para as fases estacionárias preparadas no LabCrom. Este fator de assimetria indica que há uma baixa atividade silanofílica devido ao recobrimento de toda a superfície da sílica pelo polímero.

4.3. Caracterização Físico-Química das Fases Si-PMFS

A caracterização físico-química das Si-PMFS preparadas sob os diferentes procedimentos de imobilização foi realizada apenas para a fase imobilizada a 720 W por 70 minutos de radiação microonda (condições ótimas de imobilização), para a sílica nua e para a fase sorvida por 90 dias.

Todos os experimentos de caracterização foram realizados em triplicatas.

4.3.1. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que com a imobilização por radiação microonda do polímero sobre a sílica houve uma diminuição de todos os parâmetros analisados, principalmente da área superficial. Estes resultados já eram esperados, pois com a imobilização do polímero ocorre a obstrução dos poros menores da sílica pelo polímero. Apesar disso, como se podem avaliar através dos parâmetros cromatográficos obtidos com as misturas testes, a espessura da camada de polímero formada é suficientemente fina para que haja transferência de massa adequada.

Tabela 7. Características da sílica nua e FE Si-PMFS imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos.

Material	Área superficial específica S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poro ($cm^3 g^{-1}$)	Porcentagem de carbono (%)	τ (nm)
Sílica nua	312	11,2	0,874	-	-
FE imobilizada	185	7,5	0,440	13,6	0,91

4.3.2. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

As fases estacionárias foram caracterizadas por espectroscopia de absorção no infravermelho, para a determinação da presença de grupos funcionais característicos. Na Figura 23 estão apresentados os espectros no infravermelho da sílica (A), do polímero (A), da FE sorvida por 90 dias (B) e da imobilizada nas condições ótimas de imobilização (B).

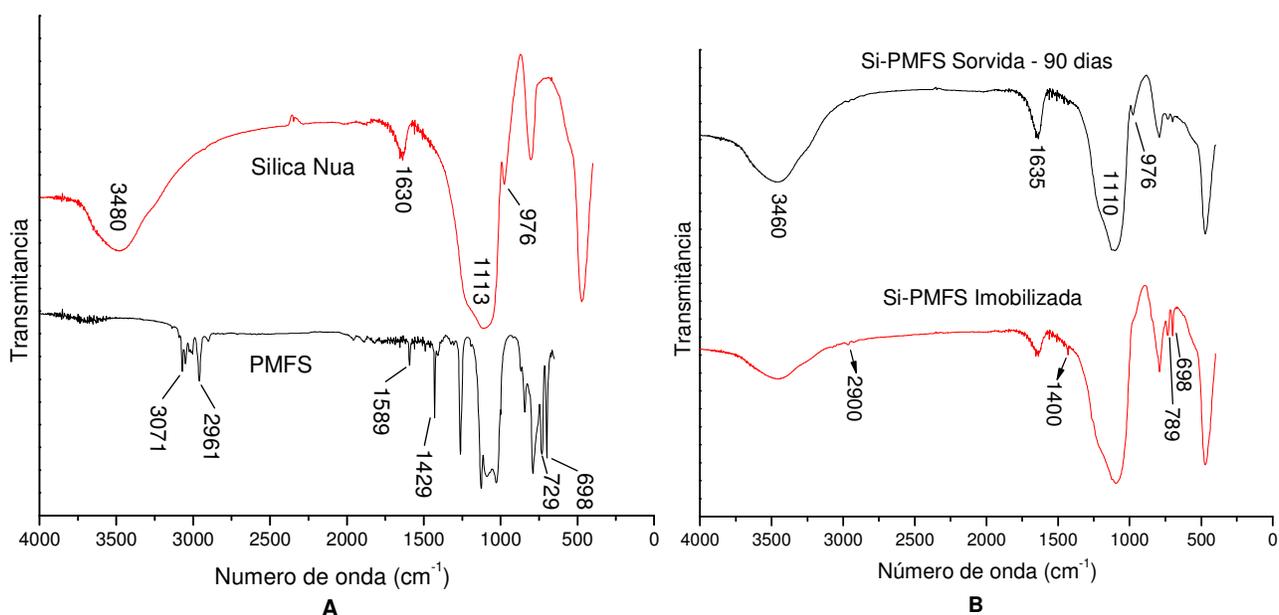


Figura 23. Espectros de absorção no infravermelho (A) Sílica Nua e Poli(metilfenilsiloxano) e (B) Fase sorvida por 90 dias e Fase imobilizada a 720 W por 70 minutos de radiação microonda.

No espectro da sílica, observam-se bandas em torno de 3480 e 1630 cm^{-1} , referentes às vibrações de grupos hidroxilas ligados à água fisicamente adsorvida por ligações de hidrogênio e também aos grupos hidroxilas geminais. É importante ressaltar a presença das bandas em 1113 e 976 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos das ligações Si-O e à deformação da ligação Si-O-H dos silanóis livres, respectivamente.

No espectro do poli(metilfenilsiloxano), pode-se ressaltar a presença de algumas bandas mais importantes, como uma banda média em 2961 cm^{-1} e

bandas fracas acima de 3000 cm^{-1} , referentes ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp^3 e sp^2 , respectivamente. De 1800 a 2000 cm^{-1} , aproximadamente, pode-se observar bandas fracas, características de anéis aromáticos, chamadas “overtone”. Também caracterizando o anel aromático, observa-se um par de bandas em 1429 e 1589 cm^{-1} , correspondente ao estiramento das ligações C=C de aromático. Em 698 e 789 cm^{-1} estão presentes bandas fortes característica da deformação C-H de anel aromático monosubstituídos.

Pode-se observar que no espectro da FE imobilizada por radiação microonda a 720 W e 70 minutos, além das bandas em 3440 , 1635 e 1100 cm^{-1} presentes na sílica, há a presença de bandas muito fracas próximas à região de 2900 e 1400 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações CH_2 e CH_3 e ao estiramento das ligações C=C do anel aromático do polímero, respectivamente. Pode-se observar também a presença das bandas em 698 e 789 cm^{-1} devido à deformação C-H do anel aromático. Estas bandas são menos intensas na fase sorvida. Estes resultados estão em pleno acordo com as porcentagens de carbono obtidas para estas fases e, desta forma, as intensidades destes sinais devem estar relacionadas com a quantidade de PMFS imobilizada na sílica.

Outra banda característica a ser observada está na região de 976 cm^{-1} . Esta banda, atribuída aos grupos silanóis livres, está com a intensidade diminuída com a imobilização do PMFS, sugerindo o recobrimento de grande parte dos grupos silanóis. É importante destacar que a intensidade desta banda é mais intensa na fase sorvida, indicando uma maior quantidade de silanóis residuais nesta fase.

4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN ^{13}C e ^{29}Si)

A funcionalidade dos silanos e os tipos de ligações químicas encontradas nas fases estacionárias podem ser determinados pela espectroscopia de RMN de ^{29}Si . A Figura 24 mostra a nomenclatura e os deslocamentos químicos característicos das espécies de silício que podem ser encontrados na superfície da sílica modificada⁶⁸.

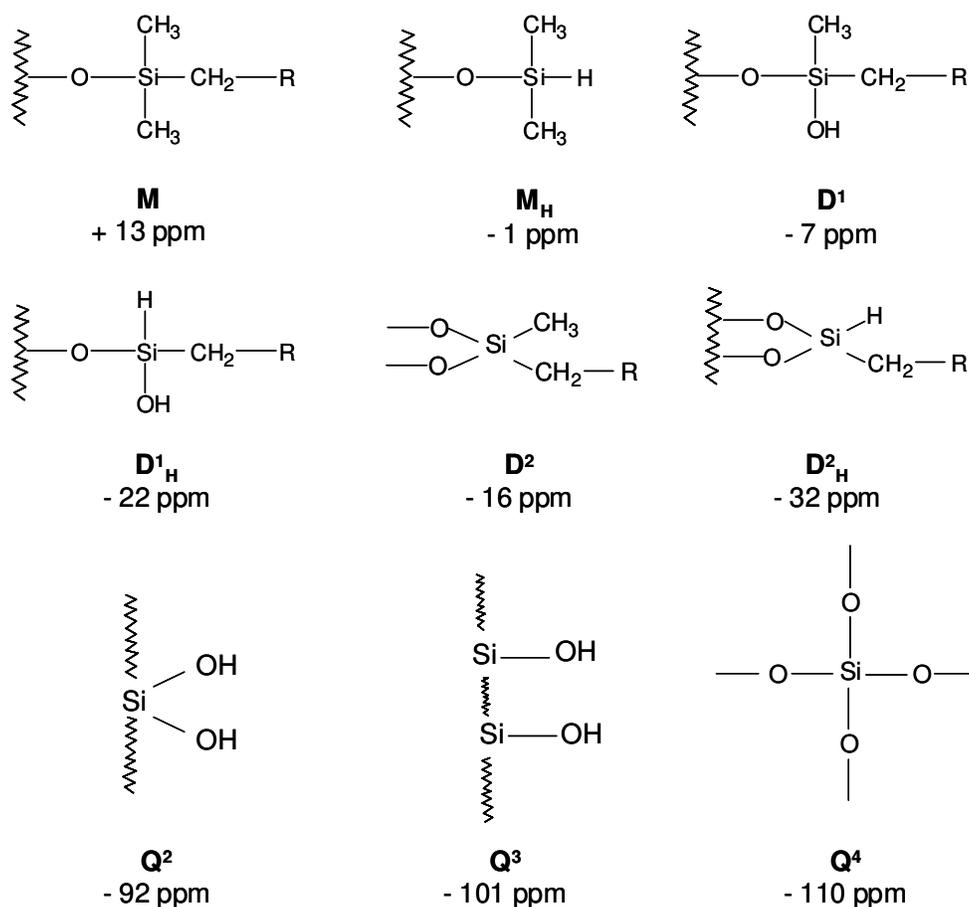


Figura 24. Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies de silício de interesse⁶⁷.

No espectro de ^{29}Si da sílica gel mostrado na Figura 25 pode-se observar os grupos que compõem a estrutura da sílica, que consistem basicamente de ligações tipo siloxano e silanóis. Os grupos silanóis são representados por picos em aproximadamente -92 ppm, atribuídos aos silanóis geminais, chamados Q^2 , e em aproximadamente -101 ppm, atribuídos aos silanóis livres e vicinais, denominados Q^3 . As ligações tipo siloxano são representadas por um pico, denominado Q^4 , em aproximadamente -110 ppm.

O espectro da fase estacionária imobilizada apresenta a espécie M ($+12$ ppm), referente aos grupos trimetil terminais do polímero, e a espécie D^2 (-35 ppm) referente aos anéis aromáticos ligados ao silício.

Apesar dos espectros de RMN medidos pela técnica CP/MAS não serem quantitativos, pode-se ressaltar a diminuição do pico referente aos silanóis geminais (Q^2) da sílica, indicando que houve uma interação dessas espécies com o polímero. Pode-se inferir também que ocorreu uma alteração na proporção entre as espécies Q^3 e Q^4 , com diminuição das espécies Q^3 em relação às espécies Q^4 , indicando que parte dos grupos silanóis livres e vicinais também interagiram com o polímero.

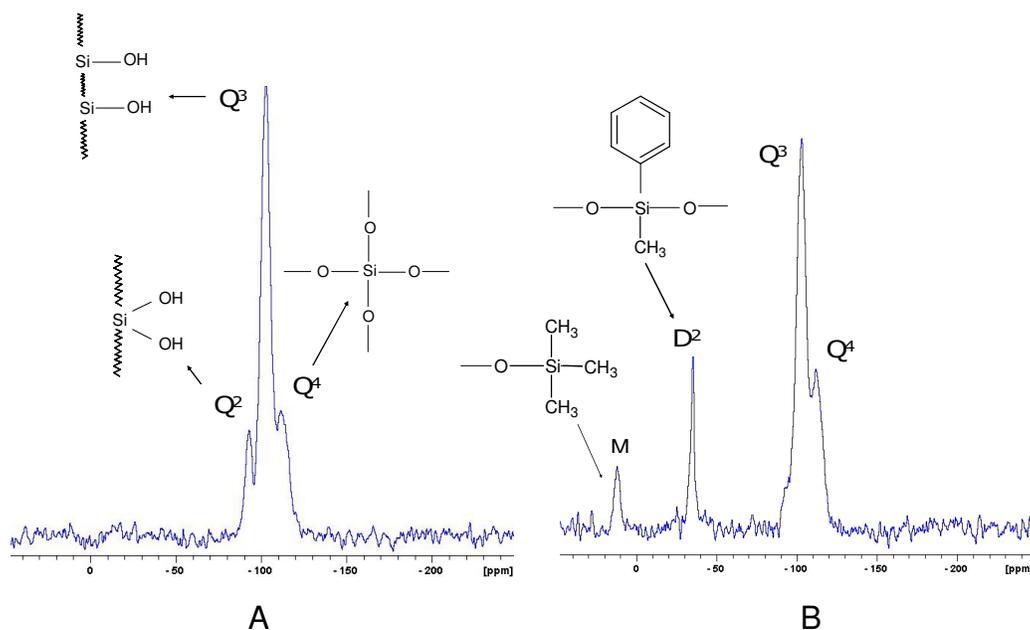


Figura 25. Espectros de RMN de ^{29}Si de A) sílica nua e B) fase estacionária imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos.

A Figura 26 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C da fase estacionária imobilizada. Os espectros apresentam dois picos em 0 ppm e 3 ppm, que representam as espécies Si-CH_3 , e picos entre 120 e 140 ppm, referentes aos carbonos dos anéis aromáticos do polímero.

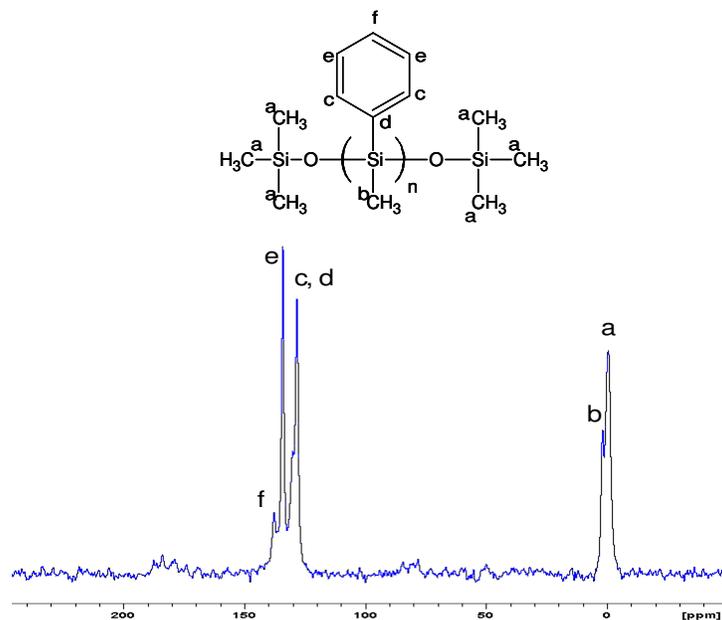


Figura 26. Espectros de RMN ^{13}C da fase estacionária imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos.

4.4. Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária Otimizada

4.4.1. Mistura Teste de Engelhardt e Jungheim

A fase estacionária de Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos foi avaliada pela mistura teste de Engelhardt e Jungheim, quanto à atividade silanofílica (atividade dos grupos silanóis residuais) e a seletividade hidrofóbica da camada polimérica. A Figura 27 apresenta o cromatograma obtido na separação desta mistura.

De acordo com Engelhardt e Jungheim⁶⁵, o fator de retenção do etilbenzeno (parâmetro que mede a hidrofobicidade) e a seletividade hidrofóbica ($\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{etilbenzeno}}/k_{\text{tolueno}}$) são proporcionais a porcentagem de carbono da FE. Como os resultados obtidos (Tabela 8), para estes fatores são altos, pode-se inferir que a porcentagem de carbono imobilizada é suficiente para que haja uma boa retenção de compostos hidrofóbicos, além disso, proporciona uma boa separação entre

compostos cuja a única diferença é a presença de um grupo metil a mais. Os valores obtidos neste teste são próximos aos obtidos para as fases C18 e C8 quimicamente ligadas estudadas por Engelhardt e Jungheim e são muito semelhante a uma fase de poli(metiltetradecilsiloxano) imobilizado por tratamento térmico sobre suporte de sílica zirconizada preparada por Faria¹¹.

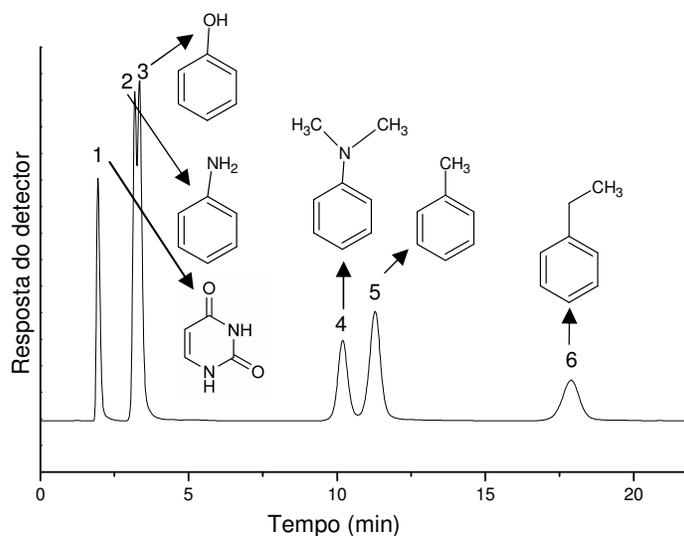


Figura 27. Cromatograma obtido na separação da mistura teste de Engelhardt e Jungheim pela fase de Si-PMFS preparada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos teste: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno.

Tabela 8. Parâmetros cromatográficos obtidos na análise da mistura de Engelhardt e Jungheim usando a fase de Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos.

α_{CH_2}	$k_{\text{etilbenzeno}}$	$\text{AS}_{(\text{anilina})}/\text{AS}_{(\text{fenol})}$	$\text{AS}_{(\text{N,N-dimetilanilina})}$	% C*
1,7	8,2	0,3	1,2	13,6

*Porcentagem de carbono da FE

De acordo com Engelhardt e Jungheim, todas as fases estacionárias consideradas “boas” apresentam comportamentos em comum em relação aos compostos básicos, tais como:

1. Anilina sempre elui antes do fenol e em alguns casos pode coeluir. Na fase preparada, pode se perceber que a anilina possui um fator de retenção ligeiramente menor que do fenol.
2. A razão entre o fator de assimetria da anilina e do fenol é sempre menor que 1,3. De acordo com a Tabela 8 observa-se que esta relação é de 0,3.
3. N,N-dimetilanilina é eluída antes do tolueno. Pelo cromatograma observa-se que esta ordem é mantida. Além disso, o fator de assimetria deste composto básico é de 1,2, considerado ótimo.

Com os valores obtidos para os compostos básicos pode-se dizer que houve um bom recobrimento do suporte cromatográfico, não havendo uma grande quantidade de sítios residuais, o que corrobora com os resultados cromatográficos e físico-químicos anteriores.

4.4.2. Misturas Testes de Tanaka

O protocolo de caracterização desenvolvido por Tanaka⁶⁶ é um método bem estabelecido que foi estudado por diversos grupos acadêmicos e muitos fabricantes de fases estacionárias comerciais para avaliar a qualidade de suas fases. Os parâmetros cromatográficos das fases medidos pelas misturas de Tanaka são altamente relevantes para os pesquisadores na área de cromatografia. Dentre as propriedades avaliadas incluem-se: o recobrimento superficial, a seletividade hidrofóbica, a seletividade estérica, a capacidade de ligação de hidrogênio e a capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6. O protocolo de Tanaka foi usado neste trabalho para avaliar as propriedades da fase de Si-PMFS preparada por imobilização por radiação microonda.

A hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$), a seletividade hidrofóbica ($\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}}$) e a seletividade estérica ($\alpha_{\text{T/O}} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenil}}$) foram obtidas pela eluição da mistura A (uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, trifenileno e o-terfenila) do protocolo de Tanaka. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 28.

Nota-se no cromatograma da Figura 28 que os picos dos alquilbenzenos, mesmo com uma alta percentagem do componente orgânico na fase móvel (80 %), estão bem resolvidos, apresentando uma boa seletividade hidrofóbica - α_{CH_2} (Tabela 9). Além disso, houve uma boa separação entre os picos do trifenileno e o-terfenil, indicando que há uma boa seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$), ou seja, há um amplo diâmetro de poros. Com isso, pode-se inferir que a radiação microonda não produziu um entrecruzamento das cadeias poliméricas.

Um fato importante a se destacar é a inversão do tempo de retenção entre o trifenileno e o-terfenil. Enquanto que nas fases estudadas por Tanaka (C18), o o-terfenil elui antes que o trifenileno, na fase estacionária com grupos fenil a ordem foi invertida, provavelmente devido a maior interação π - π entre os grupos fenil da FE e do o-terfenil por este não ser tão rígido quanto o trifenileno.

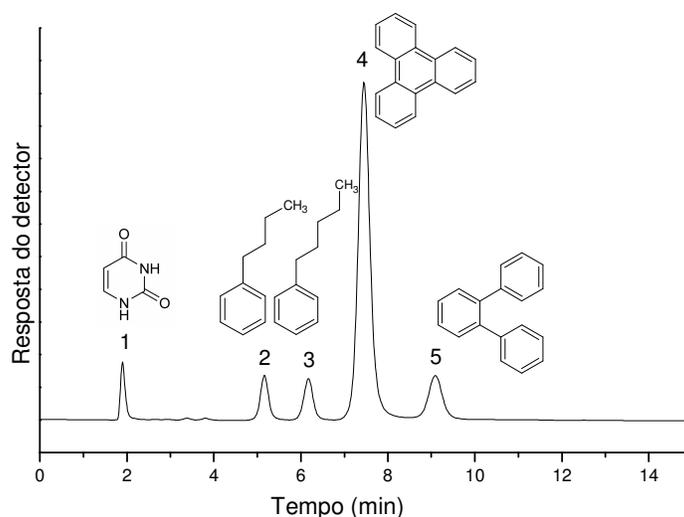


Figura 28. Cromatograma obtido na separação da mistura A do protocolo de Tanaka pela fase Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:água 80:20 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}$ C. Compostos testes: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) trifenileno e (5) o-terfenil.

Tabela 9. Parâmetros cromatográficos da fase Si-PMFS obtida pelo protocolo de Tanaka.

$k_{\text{pentilbenzeno}}$	$\alpha_{\text{CH}_2}^{\text{a}}$	$\alpha_{\text{T/O}}^{\text{b}}$	$\alpha_{\text{C/F}}^{\text{c}}$	$\alpha_{\text{B/F}}^{\text{d}}$ pH 7,6	$\alpha_{\text{B/F}}^{\text{d}}$ pH 2,7
2,3	1,35	1,31	0,63	2,0	0,05

^a $\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}}$

^b $\alpha_{\text{T/O}} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenil}}$

^c $\alpha_{\text{C/F}} = k_{\text{cafeína}}/k_{\text{fenol}}$

^d $\alpha_{\text{B/F}} = k_{\text{benzilamina}}/k_{\text{fenol}}$

A capacidade de formar ligação de hidrogênio da fase foi obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{\text{C/F}}$), empregando a mistura teste B do protocolo de Tanaka. O resultado está na Tabela 9 e no cromatograma da Figura 29. De uma maneira geral, a capacidade da FE formar ligações de hidrogênio com a cafeína é baixa, pois se fosse ao contrário a cafeína eluiria depois do fenol.

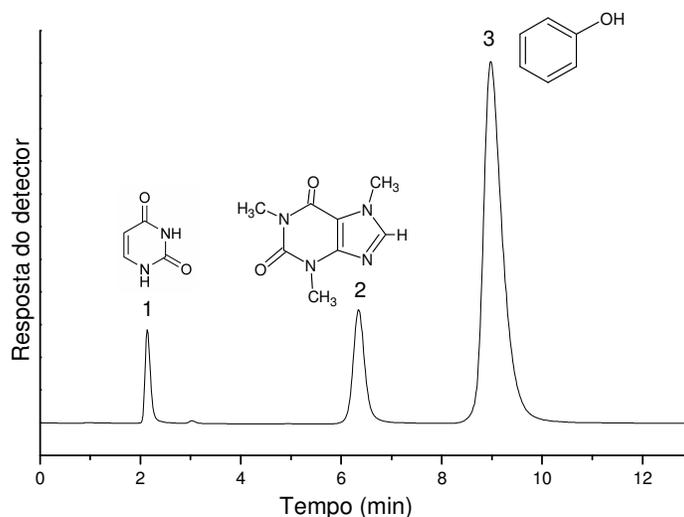


Figura 29. Cromatograma obtido na separação da mistura B do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção : 5 μL ; fase móvel: metanol:água 30:70 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) cafeína e (3) fenol.

As misturas C e D do protocolo de Tanaka foram eluídas na fase Si-PMFS para a determinação da atividade silanofílica total e da acidez dos grupos silanóis residuais da fase, respectivamente. Estas misturas são constituídas de um composto básico (benzilamina, pK_b 4,67) e um composto ácido (fenol, pK_a 9,89)

que são analisados em fases móveis tamponadas com valores diferentes de pH, (mistura C: pH 7,6 e mistura D: pH 2,7).

Em fase móvel a pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis residuais se encontram desprotonado (Si-O^-), e desta forma, devem interagir fortemente com a benzilamina, através do mecanismo de troca iônica, retendo-a fortemente ou até irreversivelmente. Como pode ser visto no cromatograma da Figura 30, o pico da benzilamina elui em aproximadamente em 10,7 minutos, com um fator de assimetria igual a 0,68 e $\alpha_{B/F}$ igual a 2,0, resultado considerado bom para a fase móvel empregada. Deste modo, pode-se concluir que a fase possui uma baixa capacidade de troca iônica a pH > 7 e uma baixa quantidade de silanóis residuais.

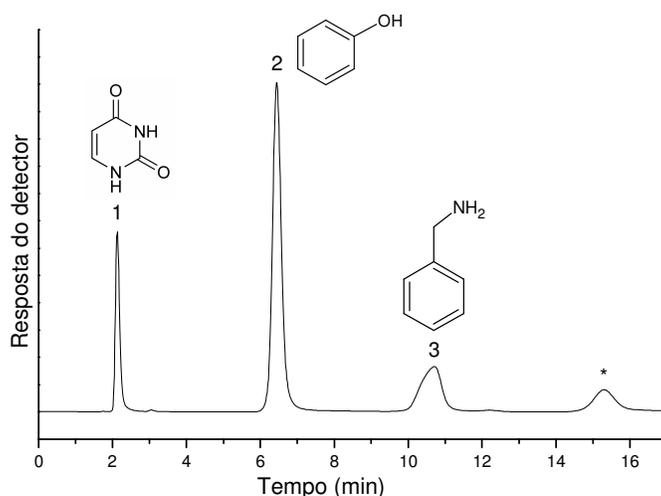


Figura 30. Cromatograma obtido na separação da mistura C do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 7,6; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

Em meio ácido (pH 2,7), a benzilamina, que neste pH se encontra protonada, eluiu praticamente junto com a uracila (Figura 31), mostrando que a coluna possui baixa capacidade de troca iônica em pH < 3.

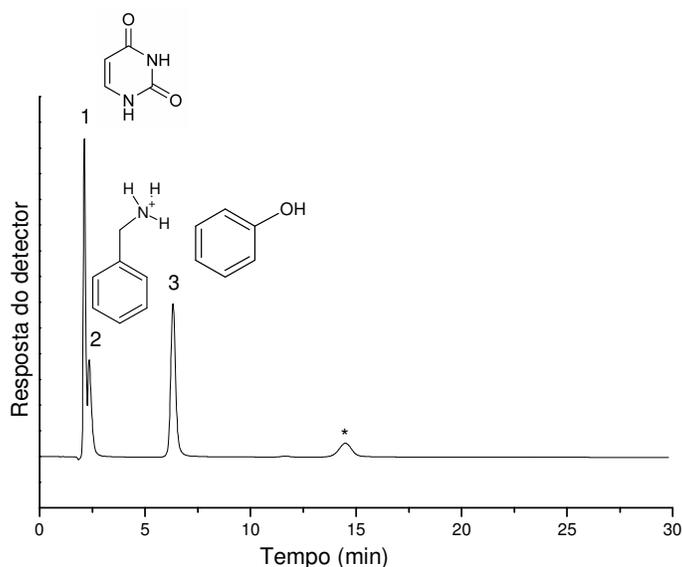


Figura 31. Cromatograma obtido na separação da mistura D do protocolo de Tanaka pela fase de Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 2,7; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzilamina, (3) fenol e (*) impurezas.

4.4.3. Misturas Testes de Szabó

Para verificar o potencial de separação da fase Si-PMFS imobilizada por radiação microonda a 720 W por 70 minutos avaliou-se a separação de duas misturas testes com vários componentes. Estas misturas testes foram utilizadas por Szabó et al.⁴⁵ com diversas fases estacionárias, dentre estas havia uma fase de fenilmetilpolissiloxano quimicamente ligada a sílica. Abaixo se encontram os cromatogramas (Figura 32 e 33) e as Tabelas 10 e 11 com os parâmetros cromatográficos dos compostos separados pela fase estacionária estudada.

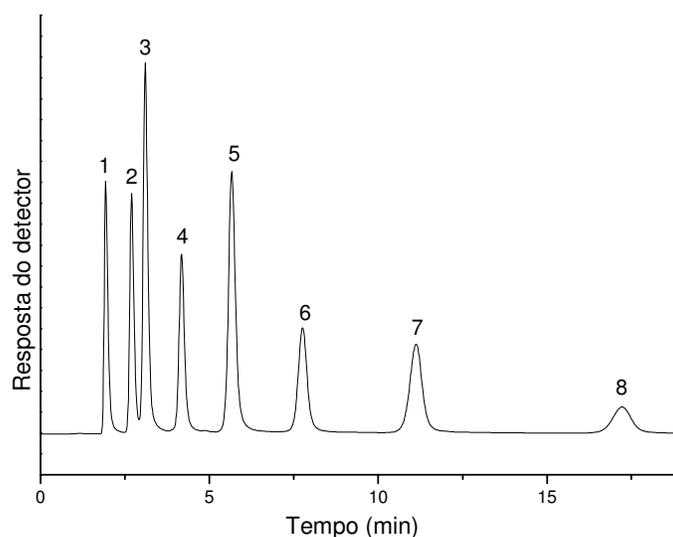


Figura 32. Cromatograma obtido na separação de 7 hidrocarbonetos aromáticos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos: (1) uracila, (2) fenol, (3) m-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) p-xileno e (8) propilbenzeno.

Pela Tabela 10 percebe-se que os fatores de retenção obtidos na FE Si-PMFS foram semelhantes aos de Szabó et al.⁴⁵ utilizando uma coluna recheada com FE quimicamente ligada com fenilmetilpolissiloxano.

Tabela 10. Parâmetros cromatográficos obtidos para os 7 hidrocarbonetos aromáticos na fase Si-PMFS.

Compostos	k	k ^a	As _{10%}	N (pratos m^{-1})	Rs
Fenol	0,4	0,6	1,7	37763	3,5 ^b
m-cresol	0,6	-	1,6	41789	1,7 ^c
Acetofenona	1,2	1,4	1,2	55820	4,0 ^d
Benzoato de Metila	1,9	2,3	1,3	60143	4,5 ^e
Tolueno	3,0	3,1	1,1	70741	4,9 ^f
p-xileno	4,7	5,1	1,0	72941	5,8 ^g
Propilbenzeno	7,8	8,1	1,0	74262	7,2 ^h

^a Fator de retenção obtido por Szabó et al. utilizando uma FE de fenilmetilpolissiloxano quimicamente ligada a suporte de sílica. ^b Calculado para o par uracila-fenol. ^c Calculado para o par fenol-m-cresol. ^d Calculado para o par m-cresol-acetofenona. ^e Calculado para o par acetofenona-benzoato de metila. ^f Calculado para o par benzoato de metila-tolueno. ^g Calculado para o par tolueno-p-xileno. ^h Calculado para o par p-xileno-propilbenzeno.

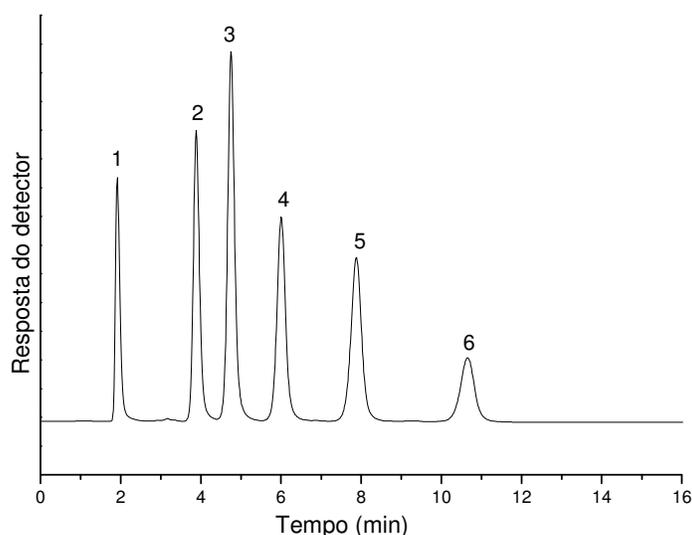


Figura 33. Cromatograma obtido na separação de 5 hidrocarbonetos aromáticos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:água 60:40 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}$ C. Compostos: (1) uracila, (2) benzeno, (3) tolueno, (4) etilbenzeno, (5) propilbenzeno e (6) butilbenzeno.

Tabela 11. Parâmetros cromatográficos obtidos para os 5 hidrocarbonetos aromáticos na fase Si-PMFS.

Compostos	k	As _{10%}	N (pratos m^{-1})	Rs
Benzeno	1,0	1,3	53723	8,3 ^a
Tolueno	1,5	1,1	58841	3,0 ^b
Etilbenzeno	2,1	1,1	63594	3,5 ^c
Propilbenzeno	3,1	1,0	69798	4,3 ^d
Butilbenzeno	4,6	1,0	71310	4,9 ^e

^a Calculado para o par uracila-benzeno. ^b Calculado para o par benzeno-tolueno. ^c Calculado para o par tolueno-etilbenzeno. ^d Calculado para o par etilbenzeno-propilbenzeno. ^e Calculado para o par propilbenzeno-butilbenzeno.

Através dos resultados obtidos percebe-se que há uma boa separação dos compostos avaliados sendo que foram obtidas eficiências elevadas e bons fatores de assimetria para a maioria dos compostos, indicando que esta fase estacionária é adequada à separação de compostos neutros e aromáticos. Além disso, o comportamento da FE imobilizada por radiação microonda apresentou-se semelhante a uma fase quimicamente ligada, utilizando polímero semelhante.

4.5. Avaliação da Aplicabilidade das Fases Estacionárias

4.5.1. Separação de Agrotóxicos

A aplicabilidade da fase estacionária preparada a partir da imobilização por radiação microonda do PMFS sobre a superfície da sílica aplicando uma potência de 720 W por 70 minutos foi avaliada na separação de cinco agrotóxicos. O cromatograma e a tabela dos parâmetros cromatográficos se encontram na Figura 34 e Tabela 12, respectivamente.

É importante ressaltar que antes da escolha destes 5 agrotóxicos, outros compostos foram estudados, tais como: imazetapir e carboxim, porém houve sobreposição de picos, principalmente entre os picos do carboxim e da cianazina. Os agrotóxicos analisados são geralmente empregados no controle de doenças e ervas daninhas em cultivo de soja, milho, cana de açúcar, abacaxi, etc, sendo todos pertencentes a classe de herbicidas.

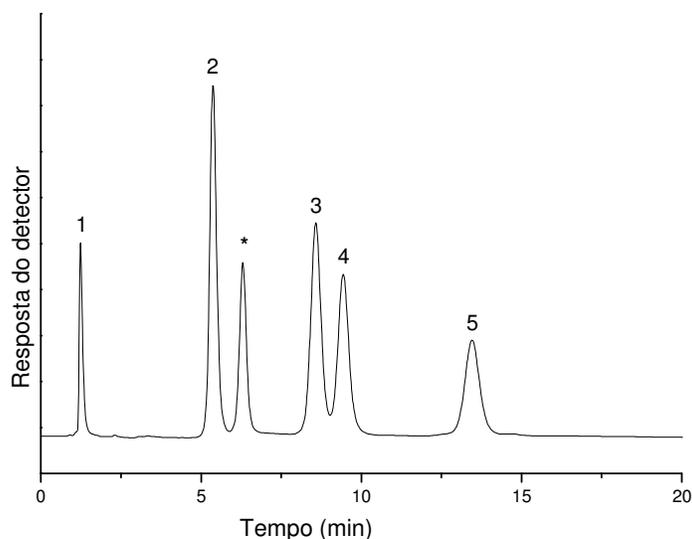


Figura 34. Cromatograma obtido na separação de 5 agrotóxicos usando a fase Si-PMFS. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:água 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Agrotóxicos: (1) imazaquim, (2) cianazina, (3) atrazina, (4) diurom, (5) linurom e (*) impurezas.

Tabela 12. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de 5 agrotóxicos usando a fase Si-PMFS.

Pesticidas	k	As_{10%}	N (pratos m⁻¹)	Rs
Imazaquim	0,0	1,9	12063	-
Cianazina	3,3	1,3	47268	14,1 ^a
Atrazina	5,9	1,2	54788	4,6 ^b
Diurom	6,6	1,0	58860	1,4 ^c
Linurom	9,8	1,1	65713	5,4 ^d

^a Calculado para o par imazaquim-cianazina. ^b Calculado para o par cianazina-atrazina. ^c Calculado para o par atrazina-diurom. ^d Calculado para o par diurom-linurom.

Apesar de ter sido usada uma coluna relativamente pequena (60 mm x 4.0 mm) com uma fase móvel neutra e eluição isocrática, uma boa separação foi obtida, com bons valores de eficiência e fator de assimetria, e em um tempo de análise relativamente curto. Este fato sugere que a aplicação desta fase estacionária para a separação dos agrotóxicos estudados possui um grande potencial.

4.6. Estabilidade Química da Fase Estacionária

A estabilidade química da fase estacionária Si-PMFS imobilizada a 720 W por 70 minutos foi avaliada em condições alcalinas drásticas de análise. Esta avaliação é comumente realizada pela passagem contínua de uma fase móvel, em condições previamente definidas, através da coluna, avaliando periodicamente o desempenho cromatográfico do acenafeno e da N,N-dimetilanilina da mistura teste 2. Neste teste, a fase móvel metanol:NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹ + NaOH pH 9,0 50:50 (v/v) foi eluída através da coluna contendo a FE a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 40 °C. Estes valores maiores de temperatura e de pH da fase móvel foram utilizados para acelerar a degradação da FE, reduzindo o tempo total da avaliação e, principalmente, o volume de fase móvel. Estas condições permitem a perda mais rápida da estabilidade química das FE, sem prejuízo de informações, comparadas a testes de estabilidade que empregam condições mais brandas de análise. Na Figura 35 estão os resultados obtidos.

No início, a fase estacionária apresentou um aumento da eficiência de 15 % e o fator de assimetria diminuiu de 1,3 a 1,0, isso se deve a melhor acomodação do leito cromatográfico devido a passagem da FM. Em cerca de 1750 volumes de coluna a eficiência diminuiu drasticamente para 50 % e o fator de assimetria aumentou para 1,5.

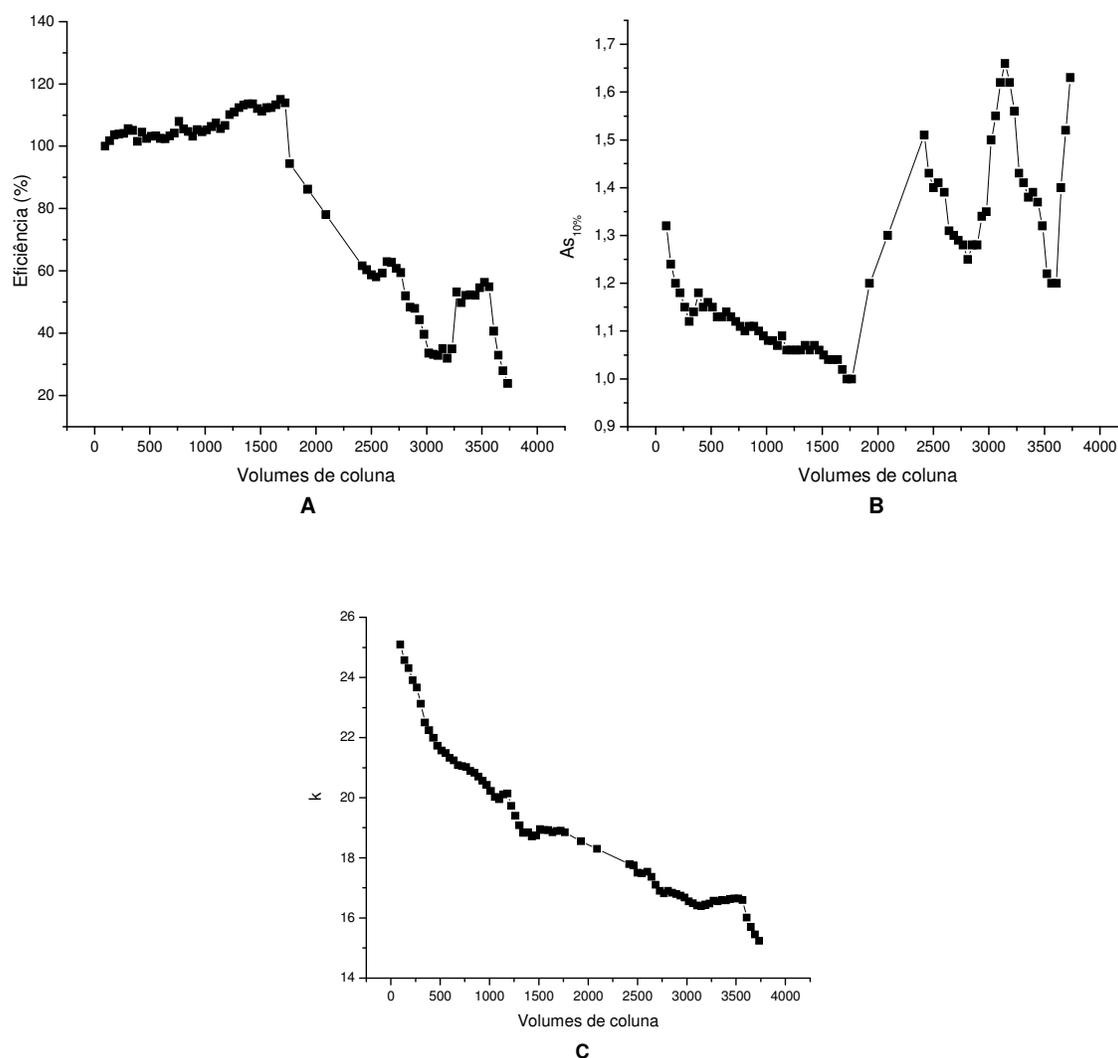


Figura 35. Resultados em termos de porcentagem de eficiência (A), fator de assimetria (B) e fator de retenção (C) calculados para o acenafteno nos testes de estabilidade da FE usando a fase móvel $\text{MeOH}:\text{NaHCO}_3$ $0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{NaOH}$ pH 9,0 50:50 (v/v) a 40°C .

Como observado em outros trabalhos no LabCrom, após o colapso do leito cromatográfico, com uma queda brusca da eficiência e um grande aumento do

fator de assimetria, houve uma ligeira recuperação, provavelmente em virtude de uma acomodação das partículas da fase estacionária. Observa-se também que o fator de retenção diminui progressivamente, indicando perda do material de recheio. O resultado obtido por Lourenço⁵⁹ com uma FE de dimetil-metil-fenilsiloxano imobilizado termicamente a sílica, utilizando as mesmas condições drásticas para o teste de estabilidade, foi que o colapso do leito cromatográfico ocorreu a 790 volumes de coluna, mostrando que a imobilização por radiação microonda pode proporcionar FE mais estáveis que a imobilização térmica.

Na Figura 36 se encontra um gráfico no qual se pode visualizar o comportamento do fator de assimetria para o composto básico N,N-dimetilanilina. Pode-se verificar que este composto básico mostrou um comportamento semelhante ao acenafteno. No início houve uma diminuição da assimetria de 1,2 a 1,1 e em 1750 volumes de coluna houve um aumento brusco.

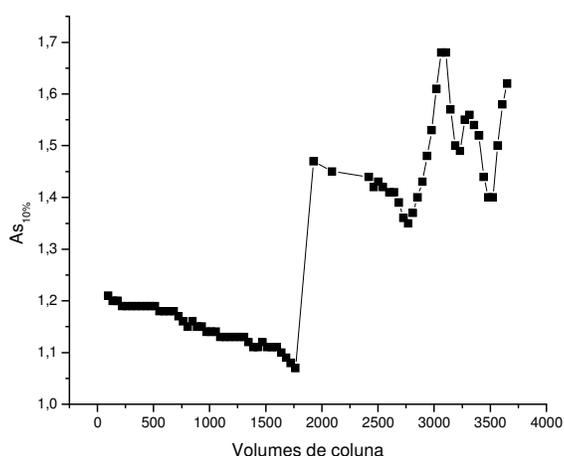


Figura 36. Resultado em termo de fator de assimetria, calculado para a N,N-dimetilanilina, nos testes de estabilidade da FE usando como fase móvel MeOH:NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹ + NaOH pH 9,0 50:50 (v/v) a 40 °C.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as fases imobilizadas por radiação microonda mostraram que a utilização do poli(metilfenilsiloxano) sobre a sílica produz fases estacionárias com grande potencialidade em cromatografia líquida de alta eficiência. Os principais atrativos desta fase são a praticidade e o baixo custo de preparação, uma vez que necessita de materiais e reagentes relativamente mais simples e mais baratos que os comumente empregados para a síntese de fases estacionárias quimicamente ligadas.

Avaliado por um planejamento composto central feito para o estudo das condições de imobilização, pode-se concluir, pelas superfícies de respostas, que uma imobilização na região de 690 a 740 W de potência por 68 a 78 minutos de radiação proporciona fases com bons desempenhos cromatográficos. As colunas preparadas a 720 W de potência por 70 minutos (valores dentro da região ótima de imobilização) apresentaram boa eficiência (72.200 pratos m^{-1} para o naftaleno), bons fatores de assimetria (1,2 para o N,N-dimetilanilina e 1,1 para o naftaleno) e estabilidade química em condições drásticas.

A FE sorvida até 90 dias não apresentou bom desempenho cromatográfico devido à baixa retenção do polímero na superfície da sílica, provavelmente devido a alta viscosidade do polímero que impede a sua distribuição homogênea nos poros da sílica.

Os bons resultados do fator de assimetria para a N,N-dimetilanilina, junto com os resultados do protocolo de Tanaka e com a mistura teste de Engelhardt e Jungheim, indicaram que houve um bom recobrimento dos silanóis livres existentes na superfície da sílica. A diminuição quase total do pico referente às espécies Q^2 , silanóis geminais, e a diminuição das espécies Q^3 , silanóis livres e vicinais, em relação às espécies Q^4 , siloxanos, nos espectros de RMN de ^{29}Si reforçam essa hipótese, e indicam que os silanóis geminais e vicinais também foram recobertos pelo polímero, podendo ter reagido com ele.

As análises cromatográficas realizadas na avaliação de várias misturas testes indicaram que esta fase é muito promissora para separação de compostos

aromáticos neutros, básicos tais como compostos farmacêuticos contendo grupos nitrogenados e agrotóxicos, e compostos ácidos tais como agrotóxicos de caráter ácido.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A.; **J. Chromatogr. A**, 1060, 23, 2004.
- 2) COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Fundamentos de Cromatografia**. UNICAMP, Campinas, 2006.
- 3) CLAESSENS, H. A.; **Trends Anal. Chem**, 20, 563, 2001.
- 4) TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; **Quím. Nova**, 25, 616, 2002.
- 5) PETRO, M.; BEREK, D.; **Chromatographia**, 37, 549, 1993.
- 6) NAWROCKI, J.; **J. Chromatogr. A**, 779, 29, 1997.
- 7) UNGER, K. K.; **Porous Silica: Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography**, Elsevier: Amsterdam, 1979.
- 8) SCOTT, R. P. W.; **Silica Gel and Bonded Phases: Their Products, Properties and Use in Liquid Chromatography**, Wiley: Chichester, 1993.
- 9) STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; TCHAPLA, A.; **Chromatographia Supplement**, 53, 113, 2001.
- 10) MAJORS, R. E.; **LC-GC**, 18, 586, 2000.
- 11) de FARIA, A. M.; **Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do Poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2006.
- 12) MEYER, V. R.; **Practical High Performance Liquid Chromatography**, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 1996.
- 13) VANSANT, E. F.; VAN DER VOORT, D.; VRANKEN, C.; **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface**, Elsevier, New York, 1997.
- 14) NEUE, U. D.; **Columns: Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.
- 15) SANDER, L. C.; WISE, S. A.; **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 18, 299, 1987.
- 16) HAKY, J. E.; DUNN, A. R. B. M.; **J. Chromatogr. A**, 541, 303, 1991.

-
- 17) UNGER, K. K.; BECKER, N.; ROUMELLOTIS, P.; **J. Chromatogr.**, 725, 115, 1978.
 - 18) LI, L.; CARR, P. W.; EVANS, J. F.; **J. Chromatogr. A**, 868, 153, 2000.
 - 19) KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; FARLEE, R. D.; **Anal. Chem.**, 61, 2, 1989.
 - 20) KIRKLAND, J. J.; DILKS, J. C. H.; HENDERSON, J. W.; **LC-GC**, 11, 290, 1993.
 - 21) SILVA, C. R.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; AIROLDI, C.; **J. Chromatogr. A**, 1030, 157, 2004.
 - 22) HANSON, M.; UNGER, K. K.; **Trends Anal. Chem.**, 11, 368, 1992.
 - 23) NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; McNEFF, C. V.; McCORMICK, A.; CARR, P. W.; **J. Chromatogr. A**, 1028, 31, 2004.
 - 24) ANAZAWA, T. A.; JARDIM, I. C. S. F.; **J. Liq. Chromatogr.**, 17, 1265, 1994.
 - 25) ANAZAWA, T. A.; JARDIM, I. C. S. F.; **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 21, 645, 1998.
 - 26) CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A.; **J. Chromatogr. A**, 1060, 23, 2004.
 - 27) KOHLER, J.; **Chromatographia**, 21, 573, 1986.
 - 28) KURGANOV, A.; PUCHKOVA, Y.; DAVANKOV, V.; EISENBEISS, F.; **J. Chromatogr. A**, 663, 163, 1994.
 - 29) MAO, Y.; FUNG, B. M.; **J. Chromatogr. A**, 790, 9 1997.
 - 30) FONSECA, D. A.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H.; **J. Chromatogr. A**, 1030, 209, 2004.
 - 31) BOTOLLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H.; **J. Chromatogr. A**, 1030, 217, 2004.
 - 32) MELO, L. F. C.; COLLINS, C. H.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; **J. Chromatogr. A**, 869, 129, 2000.
 - 33) SCHOMBURG, G.; **Trends Anal. Chem.**, 10, 163, 1991.

-
- 34) BOTTOLI, C. B. G.; **Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2002.
- 35) OHMACHT, R.; KELE, M.; MATUS, Z.; **Chromatographia**, 28, 19, 1989.
- 36) MORAIS, L. S. R.; JARDIM, I. C. S. F.; **J. Chromatogr. A**, 1073, 127, 2005.
- 37) TONHI, E.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H.; **J. Chromatogr. A**, 948, 109, 2002.
- 38) KAPOR, M. A.; **Preparação de Fases Estacionárias SiO₂(PMOS), Sorvidas e Imobilizadas por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- 39) BENTROP, D.; ENGELHARDT, H.; KOHR, J.; **Chromatographia**, 32, 171, 1991.
- 40) VANROELENBOSCH, M.; SANDRA, P.; **Chromatographia**, 14, 345, 1981.
- 41) OYLER, A. R.; ARMSTRONG, A. L.; CHA, J. Y.; ZHOU, M. X.; YANG, Q.; ROBINSON, R. I.; DUPHY, R.; BURINSKY, D. J.; **J. Chromatogr. A**, 724, 378, 1996.
- 42) OLSEN, B. A.; **J. Chromatogr. A**, 913, 113, 2001.
- 43) HÄGGLUND, I.; JANÁK, K.; BLOMBERG, L.; BENGARD, A.; CLAUDE, S. G.; LYMAN, M.; TABACCHI, R.; **J. Chromatogr. Sci.**, 29, 396, 1991.
- 44) NEIMARK, I. E.; CHERTOV, V. M.; **Dokl. Akad. Nauk. SSSR.**, 138, 877, 1961.
- 45) SZABÓ, G.; CSATÓ, E.; KERESZTES, P.; PALLOS, J. P.; **J. Chromatogr.**, 463, 345, 1989.
- 46) YANG, M. H.; CHEN, I. L.; WU, D. H.; **J. Chromatogr. A**, 772, 97, 1996.
- 47) SALO, M.; HERRALA, S.; **Chromatographia**, 37, 501, 1993.
- 48) GOSS, J. D.; **J. Chromatogr. A**, 828, 267, 1998.
- 49) SZABÓ, G.; CSATÓ, E.; OFFENMÜLLER, K.; DÉVAI, M.; BORBÉLY-KUSZMANN, A.; LIPTAI, G.; **Chromatographia**, 26, 255, 1988.
- 50) SANSEVERINO, A. M.; **Quim. Nova**, 25, 660, 2002.

-
- 51) KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B.; **Introduction to Microwave Sample Preparation**, ACS Professional Reference Book, Washington, DC, 1988.
- 52) MORAIS, L. S. R.; **Preparação de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir de Sílica Titanizada e Polibutadieno**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.
- 53) BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B.; LORENZETTI, M. C. F.; SABADINI, E.; **Quim. Nova**, 24, 901, 2001.
- 54) NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 2ª ed., Campinas, SP, Editora Unicamp, 2003.
- 55) BOX, G. E. P., HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; **Statistics for Experimental: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**, New York, Wiley, 1978.
- 56) BROWN, P. R.; WESTON, A.; **HPLC and CE Principles and Practice**, Academic Press, London, 1997.
- 57) COLLINS, K. E.; FRANCHON, A. C.; JARDIM, I. C. S. F.; RADOVANOVIC, E.; GONÇALVES, M. C.; **LC-GC**, 18, 106, 2000.
- 58) MAJORS, R. E.; **LC-GC**, 2, 502, 1984.
- 59) LOURENÇO, J.; **Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias de Dimetil-metil-fenilsiloxano sobre Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.
- 60) Perkin Elmer, **User's Manual Elemental Analysis**, Norwalk: Perkin Elmer, 1996.
- 61) GREGG, S. J.; SING, K. S. W.; **Adsorption, Surface Area and Porosity**, 2nd ed., London: Academic Press, 1982.
- 62) SILVA, R. B.; **Preparação de Fases Estacionárias para CLAE a partir de Poli(metiloctilsiloxano) sobre a Sílica Titanizada**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- 63) 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, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

-
- 64) ANAZAWA, T. A.; **Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida Sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 1992.
- 65) ENGELHARDT H.; JUNGHEIM, M.; **Chromatographia**, 29, 59, 1990.
- 66) KIMATA, K.; IWAGUCHI, K.; ONISHI, S.; JINNO, K.; EKSTEEN, R.; HOSOYA, K.; ARAKI, M.; TANAKA, N.; **J. Chromatogr. Sci.**, 27, 721, 1989.
- 67) HAMILTON, R. J.; SEWEL, P. A.; **Introduction to High Performance Liquid Chromatography**, Halsted Press, New York, 1978.
- 68) ALBERT, K.; BAYER, E.; **J. Chromatogr. A**, 1060, 61, 2004.