

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica



Dissertação de Mestrado

**POLIBUTADIENO IMOBILIZADO SOBRE SÍLICA PARA USO COMO
FASE ESTACIONÁRIA EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA E COMO SORVENTE PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Thais Proença Gorzalka

Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli

Campinas, Janeiro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

G689p Gorzalka, Thais Proença.
Polibutadieno imobilizado sobre sílica para uso como fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência e como sorvente para extração em fase sólida / Thais Proença Gorzalka. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. CLAE. 2. Polibutadieno. 3. Fase estacionária. 4. Sorvente. I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Polybutadiene immobilized on silica as stationary phase for high-performance liquid chromatography and sorbent for solid phase extraction

Palavras-chaves em inglês: HPLC, Polybutadiene, Stationary phase, Sorbent

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli (orientadora), Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP), Mauricio Xavier Coutrim (UFOP)

Data de defesa: 25/01/2008

*Aos meus pais,
Reinaldo e Terezinha, com amor,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Carla Bottoli, pela inigualável competência, entusiasmo, amizade e paciência. Por acreditar no meu trabalho e por estar sempre disposta a ajudar e aconselhar.

À Prof^ª Dr^ª Isabel Jardim por todo apoio, conselhos e valiosas sugestões feitas no exame de qualificação e na defesa desta dissertação.

À Prof^ª Dr^ª Susanne Rath pelas preciosas sugestões feitas durante o exame de qualificação.

À Prof^ª Dr^ª Carol Collins pelas correções da versão em inglês dos trabalhos apresentados em congressos e pelas correções para a versão final desta dissertação.

Ao Prof^º Dr^º Maurício Xavier Coutrim pelas importantes sugestões feitas na defesa desta dissertação.

À Nilva por todas as preciosas dicas e colaboração no decorrer deste trabalho.

À minha amiga Louise, pela rica parceria nos ensaios de extração em fase sólida e principalmente pelas boas gargalhadas e amizade.

À minha amiga Laís por toda a ajuda, dicas, apoio e amizade durante todo o trabalho.

Aos amigos do Labcrom Liane, Anízio, Camila 'Migucha', Vanessa 'Vanilda', Márcia 'Marcídia', César e Priscila pelo companheirismo, risadas e pela deliciosa convivência.

Ao Prof^º Dr^º Renato Atílio Jorge, por guiar os meus primeiros passos na pesquisa científica, pela amizade e carinho durante todos os anos de orientação na iniciação científica.

À Bel da Comissão de Pós graduação, pela competência e atenção com que sempre cuidou dos assuntos da pós-graduação.

Aos funcionários do Instituto de Química da Unicamp, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

À minha amiga e companheira de teto Carol, por todas as horas de desabafo que agüentou, pelos conselhos, pela força e principalmente pela amizade.

Aos queridos amigos bozós, Aline, Sílvia, Sara, Alvinezzi, Marcelo, Lucão, Salim e Gordoy por me ensinarem, com muita sabedoria, como rir das próprias desventuras e encarar as dificuldades com muito bom humor.

Aos meus amigos da Fersol, Alessandro, Ali, Ângelo, Clóvis, Fausto, Isis, Luci, Luzia, Marcão, Mary, Nikolai, Patrícia, Priscila, Ricardo, Rodrigo, Silvania e Stefanuto, pela rica troca de experiências que possibilitaram meu amadurecimento profissional.

À minha querida amiga e irmã de coração Tati, que sempre me apoiou, me incentivou e torceu pelo meu sucesso.

À minha amada família, aos meus pais Reinaldo e Terezinha e irmãos Raquel e Guilherme pelo amor, carinho, pela presença constante e apoio incondicional em todas as minhas decisões. Vocês foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

E a você Andrezinho, amor da minha vida, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e nos momentos mais felizes da minha vida, me apoiando, me incentivando, me dando forças e me surpreendendo todos os dias. Amo você de todo coração!

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química Analítica

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP
Mar/2004 a Jan/2008

Bacharelado em Química

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP
Fev/2000 a Dez/2003

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas, IIPF

Jul/2007 - atual: Pesquisador/Supervisor de Projetos – P&D Internacional

Fersol Indústria e Comércio S.A.

Jan/2007 a Jul/2007: Químico Pleno
Out/2005 a Jan/2007: Químico Júnior

ATIVIDADES CIENTÍFICAS

Iniciação Científica (Ago/2002 a Jul/2003)

Projeto: *Estudo da Relação Estrutura-Eficiência de Fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica*, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNICAMP (bolsa PIBIC/CNPq).

Orientador: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Iniciação Científica (Ago/2001 a Jul/2002)

Projeto: *Estudo do Efeito Sinérgico entre os íons Al^{3+} e Fe^{2+} no Estresse Oxidativo em duas Linhagens de Milho*, Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNICAMP (bolsa PIBIC/CNPq).

Orientador: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

ATIVIDADES DIDÁTICAS

Programa de Estágio Docente, PED (Mar a Jul/2005)

Instituto de Química, UNICAMP. Disciplina: Química Experimental I

Programa de Apoio Didático, PAD (Ago a Dez/2003)

Instituto de Química, UNICAMP. Disciplina: Química Geral Experimental

TRABALHOS EM EVENTOS

Gorzalka T.P., Magalhães L.L.S., Bottoli C.B.G., Jardim I.C.S.F., '*Solid phase extraction using a new sorbent based on polybutadiene for pesticide analyses in wine*', 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, ExTech (2005), Campinas, SP

Gorzalka T.P., Bottoli C.B.G., '*Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no preparo de fases estacionárias para CLAE-FR*', 13^o Encontro Nacional de Química Analítica, ENQA (2005), Niterói, RJ

Gorzalka T.P., Bottoli C.B.G., '*Preparo de fases estacionárias de polibutadieno sobre sílica utilizando peróxido e tratamento térmico para uso em CLAE-FR*', 28^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ (2005), Poços de Caldas, MG

Gorzalka, T.P.; Jorge, R.A., '*Study of structure-activity relationship of methylene blue and analogues used in photodynamic therapy*', XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq (2003), Caxambu, MG

Gorzalka, T.P.; Jorge, R.A., '*Study of synergistic effect between íons Al^{3+} and Fe^{2+} in the oxidative stress of two maize lines*', XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq (2002), Caxambu, MG

CURSOS

Nov/2007 - *Boas Práticas de Fabricação, BPF (EMS Pharma)*

Out/2007 - *Metodologias In-vitro para Estudos de Permeação e Penetração Cutânea (Flowscience)*

Jun/2007 - *BPMM, Modelagem de Processo de Negócio Multidimensional (VierF)*

Fev/2007 - *Estrutura e Documentação de Laboratório segundo a ISO 17025 (CEP)*

Out/2006 - *Auditoria Interna da Qualidade em Laboratórios segundo a ISO 17025 (REMESP)*

Out/2006 - *Validação de Métodos Analíticos (CEP)*

Nov/2005 - *Técnicas de Extração e Pré-concentração para Análises Cromatográficas (IQ-UNICAMP)*

Mar/2005 - *Métodos Cromatográficos de Separação (IQ-UNICAMP)*

Out/2004 - *Métodos Analíticos Aplicados à Determinação de Traços (IQ-UNICAMP)*

Set/2004 - *Eletroforese Capilar: Princípios Básicos e Aplicações (IQ-UNICAMP)*

Mar/2004 - *Físico-Química Coloidal e de Superfícies (IQ-UNICAMP)*

RESUMO

POLIBUTADIENO IMOBILIZADO SOBRE SÍLICA PARA USO COMO FASE ESTACIONÁRIA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E COMO SORVENTE PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Autora: Thais Proença Gorzalka
Orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um material baseado em polibutadieno (PBD) e sílica e avaliar seu desempenho como fase estacionária em cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa (CLAE-FR) e como sorvente para extração em fase sólida (SPE). O preparo do material consistiu na deposição do PBD na superfície da sílica seguida de imobilização por tratamento térmico na presença de peróxido de dicumila (PDC).

Para a aplicação como fase estacionária, algumas variáveis de preparo foram otimizadas, como a pressão de enchimento das colunas cromatográficas (5000 psi), porcentagem de carga de polibutadieno (10 % m/m), porcentagem de peróxido de dicumila (2,5 % m/m PDC/PBD), tempo, temperatura e atmosfera de tratamento térmico (1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante). A fase estacionária preparada nas condições otimizadas proporcionou colunas com eficiência de 81 000 pratos por metro para o acenafeno. Valores típicos de colunas quimicamente ligadas são de 100 000 pratos por metro. No teste de estabilidade, realizado sob condições drásticas, a fase estacionária preparada na presença de peróxido de dicumila se mostrou mais estável que a fase estacionária preparada na ausência do peróxido. Também foi observado que o PBD se altera no frasco de estocagem independente dos cuidados tomados para evitar o contato com o ar durante seu manuseio. Esta alteração resultou em redução da eficiência das colunas, dificuldade de reprodutibilidade no preparo das fases e uma maior atividade silanofílica ao longo do tempo.

Para a aplicação do material como sorvente para extração em fase sólida os cartuchos foram avaliados na extração de agrotóxicos em uma amostra de vinho. Pôde-se concluir que o sorvente baseado em polibutadieno é um material promissor, sendo comparável aos cartuchos C18 disponíveis comercialmente, apresentando boas eficiências de extração (95 - 119 %).

ABSTRACT

POLYBUTADIENE IMMOBILIZED ON SILICA AS STATIONARY PHASE FOR HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND SORBENT FOR SOLID PHASE EXTRACTION

Author: Thais Proença Gorzalka
Advisor: Carla Beatriz Grespan Bottoli

This study aimed to develop a material based on polybutadiene (PBD) and silica and to evaluate its performance as a stationary phase in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) and as sorbent for Solid-Phase Extraction (SPE). The preparation of the material consisted of the deposition of PBD onto the surface of porous silica, followed by immobilization by thermal treatment in the presence of dicumyl peroxide (DCP).

For application as a stationary phase some variables were optimized, such as packing pressure (5000 psi), polybutadiene load (10 % m/m), dicumyl peroxide load (2.5% m/m DCP/PBD), temperature, time and atmosphere of thermal treatment (1 h at 120 °C followed by 4 h at 160 °C, in an oxidizing atmosphere). The stationary phase prepared under these conditions yielded a column with efficiency of 81 000 plates per meter for acenaphthene. Typical values for chemical-bonded stationary phases are about 100 000 plates per meter. A chemical stability test, carried out under drastic conditions, showed that the stationary phase prepared in presence of dicumyl peroxide was more stable than a stationary phase prepared in the absence of peroxide. It was also observed that PBD is altered during storage, independent of the care taken to avoid contact with air during its handling. This change resulted in reduced efficiency of the columns, difficulty in reproducing preparations and higher silanophilic activity over the time.

For application of the material as a sorbent in solid-phase extraction, the prepared cartridges were evaluated for extraction of pesticides from a sample of wine. It can be concluded that a sorbent based on polybutadiene is a promising material, and is comparable to a commercially available C18 cartridge showing good efficiencies of extraction (95 - 119 %).

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ÍNDICE DE SIGLAS.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	1
1.2. SÍLICA.....	2
1.3. FASES ESTACIONÁRIAS (FE).....	4
1.3.1. Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados sobre o suporte.....	7
1.4. POLIBUTADIENO.....	9
1.5. AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	11
1.6. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	18
2. OBJETIVOS.....	23
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
3.1. REAGENTES.....	25
3.2. EQUIPAMENTOS.....	25
3.3. FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE.....	27
3.3.1. Preparo das Fases Estacionárias.....	27
3.3.2. Enchimento das Colunas Cromatográficas.....	28
3.3.3. Preparo da Fase Móvel.....	31
3.3.4. Caracterização Cromatográfica das Fases Estacionárias.....	32
3.3.5. Caracterização Física das Fases Estacionárias e da Sílica.....	33
3.3.5.1. Área superficial, Diâmetro médio e Volume específico de Poros.....	33
3.3.5.2. Porcentagem de carbono.....	34
3.3.5.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	34
3.3.6. Caracterização Física do Polibutadieno.....	34
3.3.6.1. Análise termogravimétrica (TGA).....	35
3.3.6.2. Calorimetria Diferencial por Varredura (DSC).....	35
3.3.7. Teste de Estabilidade das Fases Estacionárias.....	36
3.4. Sorventes para Extração em Fase Sólida.....	36
3.4.1. Preparo dos Sorventes.....	36
3.4.2. Preparo dos Cartuchos de SPE.....	36
3.4.3. Preparo das Soluções Padrão de Agrotóxicos.....	37
3.4.4. Processo de Extração.....	37
3.4.5. Análise Cromatográfica dos Extratos.....	39
3.4.6. Avaliação dos resultados.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. DESENVOLVIMENTO DA FASE ESTACIONÁRIA.....	41
4.1.1. Pressão de Enchimento.....	41
4.1.2. FE sorvida.....	43
4.1.3. FE imobilizada por tratamento térmico na presença de peróxido.....	45
4.1.3.1. Determinação da carga de PBD.....	45

4.1.3.2.	<i>Caracterização das Fases Estacionárias</i>	47
4.1.3.3.	<i>Estudo do Tratamento Térmico</i>	48
4.1.3.4.	<i>Estudo da quantidade de peróxido</i>	53
4.1.3.5.	<i>Reprodutibilidade de preparo da FE</i>	55
4.1.3.6.	<i>Modificação da Fase móvel</i>	59
4.1.3.7.	<i>Comparação entre frascos de PBD</i>	62
4.1.3.8.	<i>Caracterização do PBD</i>	64
4.1.3.9.	<i>Variação do suporte cromatográfico</i>	66
4.1.3.10.	<i>Repetitividade de preparo da FE</i>	69
4.1.3.11.	<i>Teste de Estabilidade</i>	71
4.2.	AVALIAÇÃO DO SORVENTE DE PBD/SÍLICA PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE). 73	
4.2.1.	Determinação do volume de amostra a ser extraído	74
4.2.2.	Eficiência de Extração.....	75
5.	CONCLUSÕES	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Parâmetros cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com uma FE comercial C18 de 3 µm de diâmetro de partícula sob pressão de 34,5 MPa e 48,3 MPa...	42
Tabela II: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE preparadas com diferentes porcentagens de carga de PBD sobre sílica.....	47
Tabela III: Valores de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros da sílica Rainin e das FE obtidas com diferentes cargas de PBD (resultados obtidos com as FE extraídas e antes do enchimento das colunas).....	48
Tabela IV: Parâmetros cromatográficos e porcentagem de carbono das FE obtidas através de diferentes condições de temperatura, tempo e atmosfera do tratamento térmico.	50
Tabela V: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE preparadas com 10 % de PBD sobre sílica, imobilizada sob tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C, na ausência de peróxido, na presença de 2,5 % e de 5 % de peróxido (m/m PDC/PBD).	54
Tabela VI: Parâmetros cromatográficos da FE otimizada (10 % PBD, 2,5 % PDC, TT: 1 h a 120° + 4 h a 160 °C, atm. oxidante) encontrados para 4 lotes preparados em tempos distintos: (a) FE preparada no início do trabalho, (b) após 7 meses, (c) após 15 meses e (d) após 17 meses do início do trabalho.	57
Tabela VII: Parâmetros cromatográficos de FE preparadas com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob os tratamentos térmicos (a) 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C preparada no início do trabalho e (b) 1 h a 160 °C preparada após 8 meses do início do trabalho.	59
Tabela VIII: Parâmetros cromatográficos de FE avaliada com diferentes fases móveis.	60
Tabela IX: Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas com FE preparadas com um PBD proveniente de frasco aberto a pelo menos 17 meses, PBD(X+17) e com um PBD proveniente de frasco aberto no dia do preparo, PBD(0).	63
Tabela X: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com dois diferentes suportes cromatográficos, sílicas Rainin (3 µm) e Kromasil (5 µm), preparadas sob as mesmas condições: 10 % PBD (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante.	68
Tabela XI: Parâmetros cromatográficos de dois lotes de FE preparados simultaneamente utilizando a sílica Rainin (3 µm), 10 % PBD (0) (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante. ..	70
Tabela XII: Porcentagens de carbono em relação à massa dos diferentes sorventes.	76
Tabela XIII: Eficiências de extração (EE) dos diferentes agrotóxicos obtidas com os cartuchos estudados.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura da sílica.	4
Figura 2: Reidroxilação dos grupos siloxano.	4
Figura 3: Microestruturas do polibutadieno (PBD).	10
Figura 4: Entrecruzamento do polibutadieno via grupos vinila pendentos	11
Figura 5: Cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes com a representação das medidas relacionadas ao cálculo dos parâmetros cromatográficos. .	12
Figura 6: Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e fator de alargamento.	14
Figura 7: Curva de van Deemter e a contribuição dos diferentes termos da equação de van Deemter no valor de altura de prato em função da velocidade linear da fase móvel.....	16
Figura 8: Esquema da coluna cromatográfica e suas conexões	29
Figura 9: Esquema do sistema de enchimento das colunas	31
Figura 10: Componentes da mistura teste.	32
Figura 11: Cartucho de extração em fase sólida.....	37
Figura 12: Acoplamento do cartucho de PBD ao cartucho de florisil durante a etapa de eluição dos agrotóxicos	38
Figura 13: Cromatogramas obtidos com colunas recheadas com uma FE comercial C18 de 3 μm de diâmetro de partícula sob pressão de 34,5 MPa (A) e 48,3 MPa (B). Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm	42
Figura 14: Cromatograma obtido com coluna recheada com FE sorvida (40 % de PBD). Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm	43
Figura 15: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com diferentes porcentagens de carga de PBD sobre sílica, imobilizadas sob TT de 1 h a 120 °C seguido de mais 4 h a 160 °C. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm.	46
Figura 16: Cromatogramas das FE obtidas através de diferentes condições de temperatura, tempo e atmosfera do tratamento térmico. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H ₂ O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min ⁻¹ ; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm.....	49
Figura 17: Espectros no infravermelho das FE preparadas com diferentes tratamentos térmicos.	52
Figura 18: Cromatograma obtido com colunas das FE preparadas com 10 % de PBD sobre sílica, imobilizada sob TT de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante (a) na ausência de peróxido, (b) na presença de 2,5 % de peróxido (m/m PDC/PBD) e (c) na presença de 5,0 % de peróxido (m/m PDC/PBD) Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-	

- dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm..... 53
- Figura 19: Estudo da reprodutividade de preparo da FE otimizada (10 % PBD, 2,5 % PDC, TT: 1 h a 120° + 4 h a 160 °C, atm. oxidante). (a) FE preparada no início do trabalho, (b) após 7 meses, (c) após 15 meses e (d) após 17 meses do início do trabalho. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm. 56
- Figura 20: Evidência de entrecruzamento do PBD no frasco de estocagem: comparação de FE preparadas com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob os tratamentos térmicos (a) 1 h a 120° + 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante preparada no início do trabalho e (b) 1 h a 160 °C preparada após 8 meses do início do trabalho. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm..... 58
- Figura 21: Variação da fase móvel na avaliação cromatográfica da coluna preparada com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob tratamento térmico de 1 h a 160 °C. (a) MeOH : H₂O pH 3,0 50:50 v/v; (b) MeOH : H₂O pH 4,0 50:50 v/v; (c) MeOH : H₂O pH 6,0 50:50 v/v; (d) MeOH : H₂O pH 8,0 50:50 v/v; (e) MeOH : Tampão fosfato pH 2,7 - 50:50 v/v; (f) MeOH : Tampão fosfato pH 7,0 - 50:50 v/v. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm. 61
- Figura 22: Cromatogramas das FE preparadas (a) com um PBD proveniente de frasco aberto a pelo menos 17 meses, PBD(X+17) e (b) com um PBD proveniente de frasco aberto no dia do preparo, PBD(0), ambos preparados com 10 % de PBD, 2,5% de PDC e imobilizados por tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm. 62
- Figura 23: Termogramas de DSC obtidos com o PBD submetido a diferentes tratamentos. 65
- Figura 24: Análise termogravimétrica do PBD em diferentes tratamentos 66
- Figura 25: Comparação das FE preparadas com suportes cromatográficos diferentes, sílicas (a) Rainin (3 µm) e (b) sílica Kromasil (5 µm) preparadas sob as mesmas condições. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm. 69
- Figura 26: Comparação entre dois lotes de FE preparados simultaneamente utilizando a sílica Rainin (3 µm), 10 % PBD (0) (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm. 70
- Figura 27: Efeito do peróxido na estabilidade da FE preparada com 10 % de PBD (m/m), imobilizada com 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante. Condições cromatográficas: FM 60:40 (v/v) MeOH:tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ (4,8 mmol L⁻¹ Na₂CO₃ + 95,2 mmol L⁻¹ NaHCO₃) pH 9,0; vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 10 µL; detecção UV, 254 nm. Vc = 0,7 mL 72

Figura 28: Estrutura química dos agrotóxicos carbaril, simazina e diurom.....	74
Figura 29: Determinação do volume de amostra a ser utilizado nas extrações de agrotóxicos em vinho.....	75
Figura 30: Comparação do desempenho dos sorventes preparados com 10 %, 20 %, 30 % m/m de PBD/SiO ₂ e sorvente comercial tipo C18 LiChrolut RP-18 na extração de agrotóxicos de uma amostra de vinho.	77

ÍNDICE DE SIGLAS

α : fator de separação
 μ : velocidade linear da fase móvel
As: assimetria
As₁₀: fator de assimetria, calculado a 10 % da altura do pico
atm: atmosfera
BET: Brunauer-Emmett-Teller.
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C_M: transferência de massa do soluto para a fase móvel
C_S: transferência de massa do soluto para a fase estacionária
DSC: Differential Scanning Calorimetry (calorimetria de varredura diferencial)
FE: Fase Estacionária
FM: Fase Móvel
FQL: Fase Quimicamente Ligada
FC: fator de concentração
FR: fase reversa
FTIR: Fourier Transform Infrared (infravermelho com Transformada de Fourier)
GPC: Gel Permeation Chromatography (cromatografia de permeação em gel)
h: altura
k: fator de retenção
L: comprimento
MeOH: metanol
N: eficiência
p: pressão de equilíbrio
p₀: pressão de saturação
PBD: Polibutadieno
PDC: Peróxido de Dicumila
PMOS: poli(metiloctilsiloxano)
Rs: resolução (parâmetro cromatográfico)
SPE: Solid Phase Extraction (extração em fase sólida)
TF: tailing factor (fator de alargamento, calculado a 5 % da altura do pico)
TGA: Thermogravimetric Analysis (análise termogravimétrica)
t_M: tempo de eluição de um composto não retido
TMS: Trimetilclorossilano
t_R: tempo de retenção
t_R' : tempo de retenção ajustado
TT: tratamento térmico
UV-DAD: Ultraviolet-Diode Array Detector (ultravioleta-detector de arranjo de diodos)
w_b: largura do pico na base
w_h: largura do pico à meia-altura

1. INTRODUÇÃO

1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação mais empregadas em laboratórios analíticos para fins qualitativos e quantitativos. A grande vantagem desta técnica está na possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, permitindo sua aplicação em diversas áreas, destacando-se as indústrias farmacêutica^{1,2,3,4} e alimentícia^{5,6}, medicina^{7,8} e química ambiental⁹.

Há diversos modos cromatográficos disponíveis em CLAE, dentre eles, fase normal, fase reversa, exclusão, troca iônica, bioafinidade e cromatografia quiral. O modo mais utilizado é a fase reversa, e neste modo a fase estacionária consiste de grupos orgânicos apolares que podem ser adsorvidos ou quimicamente ligados sobre

¹ Gilpin R.K., Gilpin C.S.; Pharmaceuticals and related drugs, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4275.

² Franeta J.T., Agbaba D., Eric S., Pavkov S., Aleksic M., Vladimirov S.; HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, *Farmaco* 57 (2002) 709.

³ Dantus M., High-performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry: Application, validation, and regulatory issues under the PAT framework, *Adv. Chrom.* 44 (2006) 237.

⁴ Ribela M.T.C.P., Gout P.W., Oliveira J.E., Bartolini P.; HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications *Curr. Pharmaceut. Anal.* 2 (2006) 103.

⁵ Perales S., Alegria A., Barbera R., Farre R.; Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid *Food Sci. Technol. Int.* (2005) 451.

⁶ Breithaupt D.E.; Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction, *Food Chem.* 86 (2004) 449.

⁷ Kamel A., Prakash C.; High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology, *Curr. Drug Metab.* 7 (2006) 837.

⁸ Kees F., Mair G., Dittmar M., Bucher M.; Cicloral versus neoral: A bioequivalence study in healthy volunteers on the influence of a fat-rich meal on the bioavailability of Cicloral, *Transplant. Proceed.* 36 (2004) 3234.

⁹ Pérez, L.M.R., Borges, J.H., Delgado M.A.R.; Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 28 (2006) 2557.

um suporte, que comumente é um óxido inorgânico como sílica, alumina, titânia ou zircônia.

1.2. SÍLICA

A sílica é o material mais amplamente utilizado em cromatografia. Mesmo após cinquenta anos de utilização em cromatografia líquida, a sílica ainda permanece superior a outros suportes cromatográficos em termos de eficiência, rigidez e desempenho¹⁰.

A sílica apresenta uma excelente resistência mecânica, podendo ser submetida às altas pressões dos enchimentos e das análises, está disponível em larga faixa de tamanhos de partícula e tamanho de poros e possui uma estrutura de poros interconectados que é praticamente ideal, já que favorece a transferência de massa e, conseqüentemente, aumenta a eficiência. Além disso, a química de silanização oferece uma ótima versatilidade para alteração das propriedades químicas de sua superfície.

A superfície da sílica é composta por grupos siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) e silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$). Os silanóis, que apresentam caráter ácido, são responsáveis pelas propriedades de superfície da sílica e podem estar presentes nas formas geminal (dois grupos hidroxila ligados a um átomo de silício), vicinal ou ligado (dois grupos hidroxila ligados a dois átomos vizinhos de silício) e isolado (um grupo hidroxila ligado a um átomo de silício) (Figura 1).

¹⁰ Nawrocki J.; The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.

Os grupos OH atuam como centros de adsorção molecular e interagem fortemente com adsorbatos capazes de formar ligações de hidrogênio¹¹. Desta forma, a sílica facilmente adsorve água e encontra-se extensivamente hidratada sob condições normais. A maioria da água fisicamente adsorvida pode ser removida da superfície a 25 °C sob vácuo, mas uma monocamada de água é retida até temperaturas de 200 °C. Acima de 200 °C, ocorre a desidroxilação dos silanóis da superfície, que é a conversão de silanóis vicinais em grupos siloxano com liberação de água, sendo que esta reação é reversível até 400 °C. Acima desta temperatura, a estrutura da sílica é irreversivelmente alterada^{10,12}.

Alguns modelos que propõem uma descrição da superfície da sílica estão descritos na literatura e são baseados em dados experimentais e estudos teóricos^{11,13}.

A concentração de grupos silanóis na superfície da sílica foi determinada em diversos trabalhos na literatura e os resultados variam de 4,1 a 8,4 $\mu\text{mol m}^{-2}$, dependendo do método utilizado para sua determinação¹⁰. A grande dificuldade na quantificação está no fato de ser praticamente impossível remover a água fisicamente adsorvida sem afetar a concentração dos silanóis. Os métodos mais confiáveis resultaram em concentrações de $(8,0 \pm 1,0) \mu\text{m}^{-2}$ e este valor é normalmente aceito como a concentração de silanóis na superfície da sílica completamente hidroxilada¹².

¹¹ Zhuravlev L.T.; The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, *Colloids and Surfaces A*, 173 (2000) 1.

¹² Cox G. B.; The influence of silica structure on reversed-phase retention, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 353.

¹³ Hassanali A.A., Singer S.J.; Model for water-amorphous silica interface: An undissociated surface, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 11181.

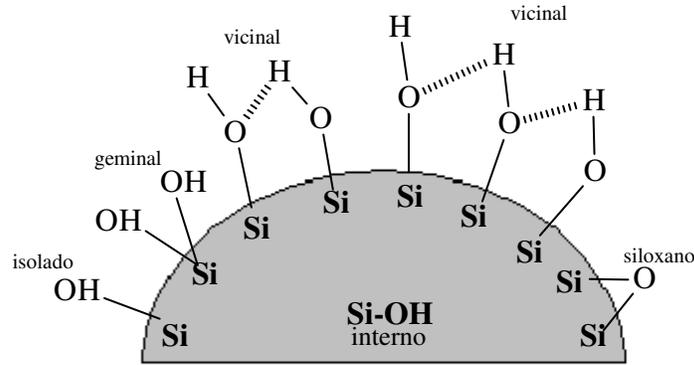


Figura 1: Esquema da estrutura da sílica. Adaptado de [10].

Os silanóis desempenham papel fundamental na derivatização da sílica e a reidroxilação (reposição dos grupos silanóis da superfície através do tratamento com soluções aquosas ácidas, Figura 2) é frequentemente aplicada antes da síntese de fases quimicamente ligadas.

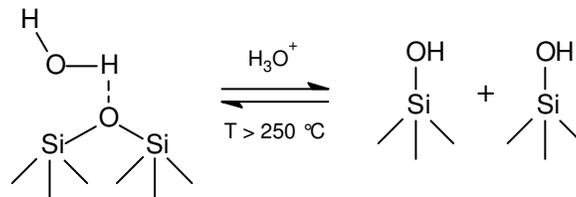


Figura 2: Reidroxilação dos grupos siloxano¹⁴.

1.3. FASES ESTACIONÁRIAS (FE)

Como as fases estacionárias para utilização em fase reversa devem apresentar caráter apolar e a superfície dos óxidos utilizados como suporte é polar, deve-se então introduzir grupos orgânicos apolares nas suas superfícies. Há basicamente três

¹⁴ von Hohenesche C.D., Ehwald V., Unger K.K.; Development of standard operation procedures for the manufacture of n-octadecyl bonded silicas as packing material in certified reference columns for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 177.

métodos para se obter as camadas orgânicas apolares sobre a superfície dos suportes¹⁵:

I) ligação química de reagentes com grupos reativos na superfície do suporte;

II) polimerização ou policondensação de monômeros fisicamente sorvidos na superfície com ou sem ligação química da camada polimérica ao suporte;

III) sorção e/ou imobilização de (pré) polímeros fisicamente sorvidos na superfície com ou sem ligação química da camada polimérica ao suporte.

O método mais empregado no preparo das colunas cromatográficas comerciais é o tipo I, obtendo-se assim as chamadas fases quimicamente ligadas (FQL). Existem numerosos procedimentos para obtenção das FQL¹⁶, os quais conduzem à formação de quatro diferentes ligações: Si-O-C, Si-C, Si-N e Si-O-Si¹⁷. A ligação Si-O-C apresenta problemas de estabilidade hidrolítica frente a fases móveis aquosas ou alcoólicas, enquanto a ligação Si-C é bastante estável. Infelizmente o custo dos reagentes necessários para a formação da ligação Si-C torna este método economicamente inviável. As ligações Si-O-Si são formadas em reações de organossilanização, que ocorre entre os silanóis e agentes sililantes do tipo $R_1R_2R_3SiX$, onde normalmente $X=Cl$ ou OR . Quando R_1 , R_2 e R_3 são grupos alquila, sendo R_1 a cadeia alifática que se deseja inserir no suporte, o agente sililante é chamado monofuncional. Se $R_3 = X$, o agente é difuncional e se $R_2 = R_3 = X$ o agente sililante é trifuncional. Dependendo

¹⁵ Hanson M.; Polymer-coated reverse-phase packings in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 369.

¹⁶ Tonhi E., Collins K.E., Jardim I. C. S. F., Collins C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quím. Nova* 25 (2002) 616.

¹⁷ Stella C., Rudaz S., Veuthey J.-L.. Tchaplá; Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I, *Chromatographia Supp.* 53 (2001) S-113.

destas funcionalidades e das condições empregadas na síntese (presença ou ausência de água) as fases estacionárias irão apresentar características diferentes. A síntese com silanos di ou trifuncionais realizada na presença de água leva a formação de estruturas chamadas poliméricas uma vez que a água pode hidrolisar o agente sililante, provocando reações de policondensação e entrecruzamento entre os agentes sililantes, formando uma rede tridimensional sobre o suporte de sílica^{16,17}. Este método apresenta problemas de baixa eficiência e dificuldade de reprodutibilidade lote a lote e, portanto, é pouco empregado. Já a síntese conduzida na ausência de água, leva à formação de estruturas monoméricas, que se constituem de camadas finas e estruturas bem definidas, e é atualmente o método mais utilizado para modificação da superfície da sílica.

No entanto, devido à impedimentos estéricos, somente uma pequena porção dos silanóis presente na superfície da sílica reage com os organossilanos e os silanóis residuais irão interagir com solutos de caráter básico durante uma análise cromatográfica, resultando em picos com cauda, perda de resolução cromatográfica e até casos de retenção irreversível. Além disso, grupos silanóis e siloxanos não bloqueados sofrem dissolução na presença de fases móveis básicas (muitas vezes requeridas para análises de fármacos e agrotóxicos), provocando perda do recheio e, conseqüentemente, provocando o colapso do leito da coluna. Portanto, fases quimicamente ligadas não devem operar em pH maior que 8 para evitar a dissolução da sílica e nem em pH menor que 2, para evitar a hidrólise da ligação Si-O-Si que ancora a fase orgânica apolar ao suporte.

Para reduzir a atividade dos silanóis residuais, a técnica de capeamento (*end-capping*, em inglês) é frequentemente utilizada e envolve um processo de silanização

secundário, ou seja, o tratamento da sílica com agentes sililantes de baixa massa molar como trimetilclorossilano (TMS), hexametildisilano (HMDS) e trimetilsililimidazol após o processo de ligação do grupo pedante. Estes reagentes substituem o hidrogênio do silanol por um grupo trimetilsilil ((CH₃)₃-Si), o que reduz significativamente o acesso aos silanóis^{10,18}.

Apesar das muitas tentativas de eliminação dos silanóis, ainda é possível detectar a presença de silanóis livres nas fases quimicamente ligadas¹⁹.

1.3.1. Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados sobre o suporte

A obtenção de fases estacionárias através do recobrimento dos suportes com polímeros tem se tornado de grande importância em CLAE-FR. Estas fases apresentam uma série de vantagens em relação às quimicamente ligadas, como o maior recobrimento dos sítios ativos do suporte, a simplicidade do preparo e a possibilidade de maior seletividade pela escolha do polímero apropriado. A seletividade é influenciada pelas características químicas dos grupos funcionais nas cadeias dos polímeros, pela espessura do filme polimérico e pela área superficial e estrutura de poros do suporte¹⁶. A enorme variedade de polímeros disponível possibilita o preparo de fases estacionárias em uma grande faixa de seletividade.

¹⁸ Buszewski B., Krupczynska K., Rychlicki G., Lobinski R.; Effect of coverage density and structure of chemically bonded silica stationary phases on the separation of compounds with various properties, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 829.

¹⁹ Buchmeiser M.R.; New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 233.

Há duas maneiras de depositar o material polimérico sobre a superfície do suporte cromatográfico. Na primeira, mistura-se o polímero em solução com o suporte e o solvente é posteriormente evaporado obtendo-se a fase sorvida, sendo que, neste caso ocorre a contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o polímero e o suporte. A insolubilidade do polímero também é importante neste tipo de fase. Na segunda maneira de deposição, promove-se a polimerização *in situ* de monômeros sobre o suporte. Em ambos os casos é possível controlar a espessura da camada através da quantidade de polímero ou monômeros adicionada¹⁶.

A imobilização dos polímeros orgânicos sorvidos no suporte pode ser obtida através do entrecruzamento das camadas poliméricas induzido por tratamento térmico^{20,21}, radiação ionizante-gama^{22,23} ou radiação microondas^{24,25}.

O processo de imobilização é complexo e é influenciado pela contribuição dos diferentes tipos de interações adsorptivas entre o polímero e o suporte, de interações

²⁰ Vigna C.R.M., Bottoli C.B.G., Collins K.E., Collins C.H.; Preparation of stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography using thermal treatments at high temperature, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 60.

²¹ Bottoli C.B.G., Chaudhry Z.F., Fonseca D.A., Collins K.E., Collins C.H.; Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 121.

²² Faria A.M., Collins K.E., Collins C.H.; Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 51.

²³ Anazawa T.A., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Chromatographic comparison of self-immobilized and radiation-immobilized poly(methyloctylsiloxane) stationary phases on various silicas. *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 116.

²⁴ Morais L.S.R., Jardim I.C.S.F.; Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica. *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 127.

²⁵ Lopes N.P., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 225.

entre as moléculas imobilizadas ao suporte e também da insolubilidade do polímero depositado nos eluentes utilizados^{16,26}.

Dentre os polímeros já utilizados, destacam-se os polissiloxanos^{27,28,29,30} polietileno^{31,32}, poliestireno³³ e polibutadieno^{34,35}.

1.4. POLIBUTADIENO

O polibutadieno (PBD) é um elastômero sintético que apresenta duplas ligações em sua estrutura, podendo existir em três formas isoméricas: 1,4-cis, 1,4-trans e unidades 1,2 ou vinil (Figura 3).

²⁶ Petro M., Berek D.; Polymers Immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography, *Chromatographia* 37 (1993) 549.

²⁷ Tonhi E., Collins K.E., Collins C.H.; High performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 87.

²⁸ Tonhi E., Collins K. E., Collins C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseadas em polissiloxanos com cadeias laterais C1, C8 e C14 imobilizados sobre partículas de sílica porosa, *Revista Analytica* 14 (2005) 58.

²⁹ Faria, A.M., Tonhi E., Collins K. E. Collins, C.H.; Stability studies of stationary phases from poly(methyltetradecylsiloxane) sorbed and immobilized onto metalized and unmodified silicas. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1844.

³⁰ Bottoli C.B.G., Silva C.R., Collins K.E., Collins C.H.; Adsorption/immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silanized silicas. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 407.

³¹ Nasal A., Haber P., Kaliszan R., Forgács E., Cserhádi T., Abraham M.H.; Polyethylene-coated silica and zirconia stationary phases in view of quantitative structure-retention relationships, *Chromatographia* 43 (1996) 484.

³² Forgács, E.; Cserhádi, T.; Use of principal component analysis for studying the separation of pesticides on polyethylene-coated silica columns, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 33.

³³ Kurganov A., Davankov V., Isajeva T., Unger K., Eisenbeiss F.; Characterization of covalently bonded and adsorbed polymer coatings on silica, alumina and zirconia by means of physico-chemical and chromatographic methods, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 97.

³⁴ Rigney M.P., Weber T.P., Carr P.W.; Preparation and evaluation of a polymer-coated zirconia reversed-phase chromatographic support, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273.

³⁵ Hanson M., Unger K. K. , Schomburg G.; Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr.* 517 (1990) 269.

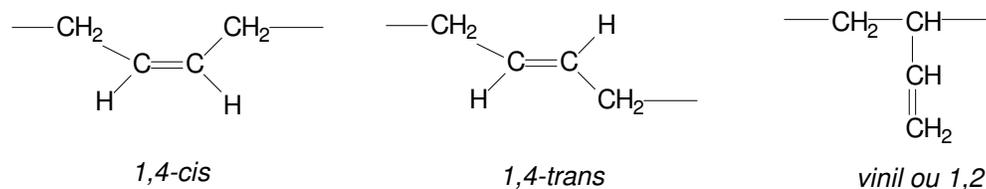


Figura 3: Microestruturas do polibutadieno (PBD).

Este polímero foi utilizado pela primeira vez como FE reversa em 1984 por Schomburg e colaboradores³⁶ e seu desempenho tem sido descrito em diversos trabalhos nos quais diferentes suportes e processos de imobilização foram utilizados para preparar fases estacionárias^{15,24,25,37}. O polibutadieno apresenta as seguintes características desejáveis para atuar em CLAE-FR: resistência mecânica, seletividade e é estável frente à fases móveis aquosas e pH elevado³⁷.

Em dois trabalhos anteriores do grupo de pesquisas do LabCrom (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida da Unicamp)^{38,39}, obtiveram-se fases estacionárias baseadas em sílica ou sílica titanizada e polibutadieno de boa qualidade cromatográfica. Estas fases estacionárias foram obtidas a partir da sorção do polibutadieno em sílica e sílica titanizada e posterior imobilização com tratamento térmico ou radiação gama ou microondas sem a presença de agentes de entrecruzamento.

³⁶ Schomburg G., Köhler J., Figge H., Deege A., Bien-Vogelsang U.; Immobilization of stationary liquids on silica particles by γ -radiation, *Chromatographia* 18 (1984) 170.

³⁷ Arenas R.V., Foley J.P.; Solvent strength, selectivity and retention mechanism studies on polybutadiene-coated alumina columns in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 113.

³⁸ Lopes N.P.; Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para cromatografia líquida de alta eficiência, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

³⁹ Moraes 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.

Durante o processo de imobilização térmica de polímeros sobre a sílica, um agente de entrecruzamento, que é normalmente um peróxido, pode ser usado. Durante o aquecimento, ocorre a homólise da ligação peróxido⁴⁰, gerando radicais que são responsáveis pelo entrecruzamento do polímero, aumentando sua insolubilidade e, portanto, aumentando sua estabilidade química²⁶. O entrecruzamento do polibutadieno ocorre via grupos vinila pendentos, como esquematizado na Figura 4¹⁹.

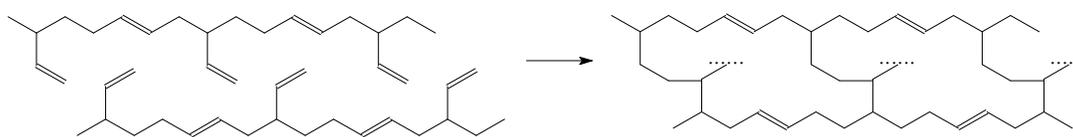


Figura 4: Entrecruzamento do polibutadieno via grupos vinila pendentos¹⁹

1.5. AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

O desempenho da coluna depende do tipo de separação para a qual ela será empregada e não pode ser expresso por uma única variável. Para isto, são usados os parâmetros cromatográficos, que servem para avaliar o desempenho das colunas: eficiência ou número de pratos (N), resolução entre picos (Rs), fator de retenção (k), fator de separação (α) e assimetria (As). Estes parâmetros são visualizados ou medidos a partir de cromatogramas obtidos com a coluna. A Figura 5 mostra um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes.

⁴⁰ Vilar W.D., Moutinho M.T.M., Menezes S.M.C., Coutinho F.M.B.; Characterization of hydroxyl-terminated polybutadiene, *Polym. Bull.* 38 (1997) 319.

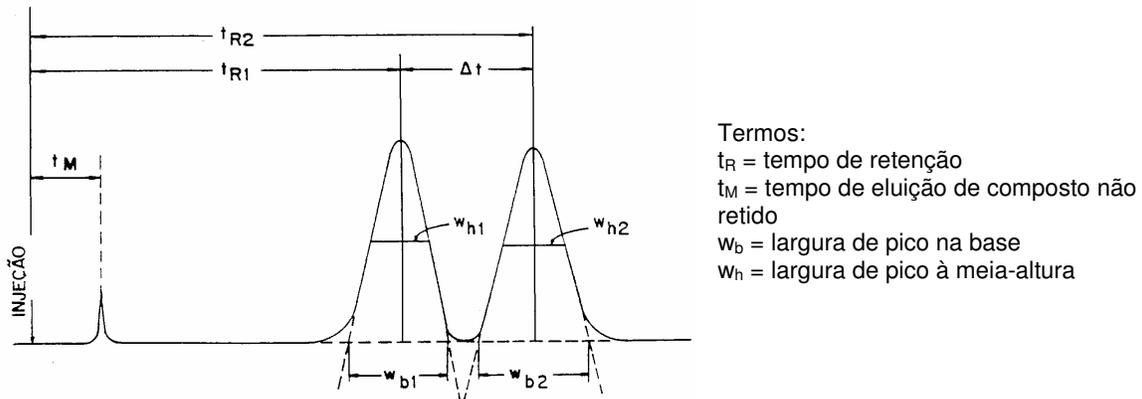


Figura 5: Cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes com a representação das medidas relacionadas ao cálculo dos parâmetros cromatográficos⁴¹.

Tempo de retenção (t_R) é o tempo gasto entre a injeção da amostra e o surgimento do máximo do pico correspondente⁴².

Tempo de eluição de um composto 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 da amostra até a chegada ao detector. Pode ser notado como um deslocamento ou distúrbio da linha de base ou um pico de solvente, caso o solvente da amostra seja diferente da fase móvel⁴³.

⁴¹ Collins, C. H., Braga G. L., Bonato P. S.; Fundamentos de cromatografia, Editora da Unicamp, Campinas – SP, (2006).

⁴² Ettre, L. S.; Nomenclature for Chromatography, *Pure & Appl. Chem.* 65 (1993) 819.

⁴³ Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services - *Pesticide Analytical Manual*, vol. 1 (1999).

Tempo de retenção ajustado (t_R') é a diferença entre o tempo de retenção de um determinado composto e o tempo de eluição de um composto não retido. Representa o tempo que o composto foi retido pela fase estacionária.

$$t_R' = t_R - t_M \quad \text{Eq. 1}$$

Fator de retenção (k) é a medida do tempo que um componente da amostra reside na fase estacionária comparado ao tempo que ele reside na fase móvel. Expressa o quanto um componente da amostra é retardado pela fase estacionária em relação à eluição do mesmo componente através da coluna com a velocidade da fase móvel⁴². Matematicamente, é a razão entre o tempo de retenção ajustado e o tempo de eluição de composto não retido.

$$k = \frac{t_R'}{t_M} \quad \text{Eq. 2}$$

Assimetria (As) descreve a forma do pico cromatográfico. Dois termos são utilizados para medir a simetria dos picos: o fator de assimetria (As_{10}), calculado a 10 % da altura do pico e o fator de alargamento ou '*tailing factor*' (TF), calculado a 5 % da altura do pico (Figura 6). A teoria assume um pico simétrico, uma curva Gaussiana, mas distorções frontais ou posteriores (caudas) podem ser causadas por efeitos extra-coluna, deterioração do recheio da coluna, incompatibilidade entre o analito e a fase estacionária e/ou suporte, etc⁴³.

$$As_{10} = \frac{b}{a} \quad \text{Eq. 3}$$

$$TF = \frac{a+b}{2a} \quad \text{Eq. 4}$$

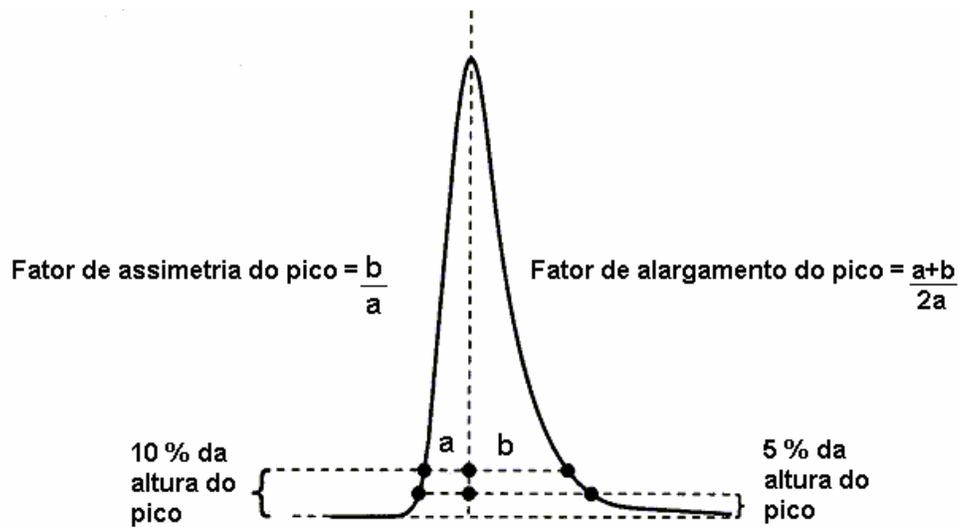


Figura 6: Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria e fator de alargamento⁴¹.

Número de Pratos ou Eficiência (N) o número de pratos é um indicativo do desempenho da coluna. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior for o número de pratos de uma coluna, mais equilíbrios existirão e, portanto, melhor a separação. A eficiência pode ser calculada através das equações 5 e 6:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad \text{Eq. 5}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{Eq. 6}$$

Para permitir a comparação entre colunas de diferentes tamanhos, utiliza-se comumente a expressão da eficiência em pratos por metro (N/m).

$$N/m = \frac{N}{L} \quad \text{Eq. 7}$$

onde L = comprimento da coluna em metros

Em termos práticos, a eficiência da coluna está associada à largura do pico cromatográfico. Quanto mais estreito for o pico, maior a eficiência da coluna na separação dos analitos. O alargamento ocorre devido à dispersão da amostra ao longo do sistema cromatográfico e pode ser minimizado utilizando altas vazões de fase móvel. Por outro lado, a redução de tempo de permanência do soluto na coluna restringe o estabelecimento de etapas de equilíbrio entre o soluto e as fases móvel e estacionária, provocando a redução da eficiência. Uma maneira de superar este impasse é o emprego da chamada curva de van Deemter, que revela o compromisso entre a velocidade linear e a eficiência e permite a obtenção de um ponto ótimo, onde é possível a máxima velocidade com a máxima eficiência.

A equação clássica de van Deemter também é utilizada para expressar a eficiência de uma coluna em função da altura do prato (H):

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu \quad \text{Eq. 8}$$

onde μ é a velocidade linear da fase móvel, calculada de acordo com a equação 9 e H é calculado de acordo com a equação 10.

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad \text{Eq. 9}$$

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Eq. 10}$$

O termo A da equação de van Deemter é a difusão turbilhonar responsável pelo alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do

soluto no interior da coluna cromatográfica. Uma maneira de minimizar este efeito é utilizar colunas de diâmetro interno reduzido e partículas pequenas e uniformes⁴⁴.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares 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 a fase móvel e a fase estacionária. O termo C subdivide-se em C_M e C_S , onde C_M é a transferência de massa do soluto para a fase móvel e C_S é a transferência de massa do soluto para a fase estacionária. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

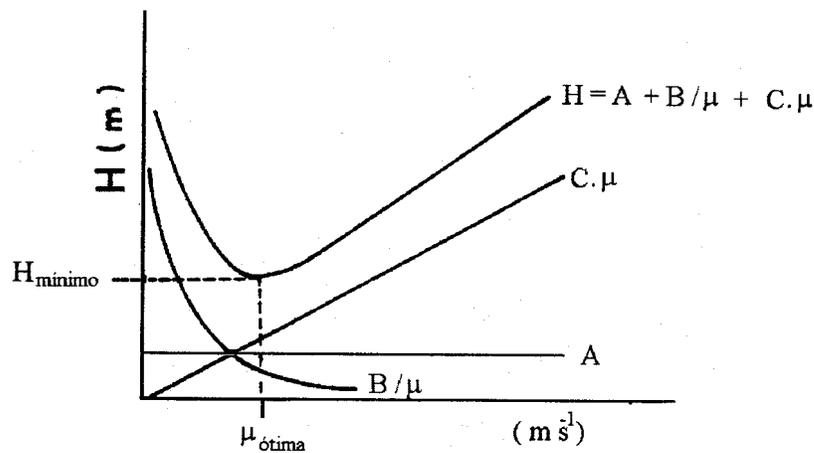


Figura 7: Curva de van Deemter e a contribuição dos diferentes termos da equação de van Deemter no valor de altura de prato em função da velocidade linear da fase móvel⁴¹.

Fator de Separação (α) é um fator termodinâmico que mede a habilidade de uma específica combinação coluna/fase móvel de promover diferentes graus de retenção para duas substâncias⁴³. Algumas vezes, α é chamado de 'seletividade', embora o uso

⁴⁴ Brown, P.R., Weston A.; HPLC and CE Principles and Practice, Academic Press, London, 1997.

deste termo seja desencorajado⁴². O fator de separação é calculado para dois picos adjacentes.

$$\alpha = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Eq. 11}$$

Resolução (Rs) expressa a separação entre dois picos adjacentes em termos da largura do pico na base ou a meia-altura.

$$Rs = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) \quad \text{Eq. 12}$$

$$Rs = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right) \quad \text{Eq. 13}$$

Valores de Resolução maiores que 1,25 são suficientes para fins quantitativos e $Rs > 1,5$ indica separação completa⁴¹.

Numerosos estudos têm sido feitos na tentativa de avaliar e caracterizar colunas cromatográficas de fase reversa^{45,46,47,48,49}.

Estes testes visam entender o comportamento cromatográfico dos recheios e, assim, fornecer uma base para seleção da coluna.

⁴⁵ Jandera P., Novotná K.; Characterization of high pressure liquid chromatography columns using chromatographic methods, *Anal. Letters* 39 (2006) 2095.

⁴⁶ Stella C., Rudaz S., Veuthey J.-L., Tchaplá; Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part II, *Chromatographia Supp.* 53 (2001) S-132.

⁴⁷ Stella C., Seuret P., Rudaz S., Carrupt P.-A., Gauvrit J.-Y., Lanteri P., Veuthey J.-L.; An effective tool for column evaluation in the analysis of basic compounds, *Chimia* 57 (2003) 210.

⁴⁸ Engelhardt H., Arangio M., Lobert T; A chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation, *LC/GC* 15 (1997) 856.

⁴⁹ Wieland G., Cabrera K., Eymann W; A proposal for a universal column quality certificate for HPLC columns, *LC/GC* 15 (1997) 98.

Algumas das propriedades físico-químicas de maior interesse em se avaliar são:

- Capacidade de retenção hidrofóbica: o fator de retenção k de um composto teste neutro é avaliado. Quanto maior o valor de k , maior é a porcentagem de carbono na coluna.

- Seletividade hidrofóbica: o fator de separação (α) entre dois compostos teste não polares ou não muito polares é avaliada. Quanto maior o valor de α , melhor é a separação.

- Atividade silanofílica: a assimetria (A_s), a eficiência (N) e o fator de separação (α) de compostos teste básicos são avaliados para caracterizar o grau de interações com os silanóis residuais do suporte cromatográfico⁴⁶.

Ainda há muita discussão a cerca de um método universal para a caracterização de fases estacionárias. Assim, a avaliação das colunas deve ser feita levando em consideração o tipo de fase estacionária e a aplicação pretendida.

1.6. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Uma das etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas ou amostras “reais” consiste na extração e no isolamento dos analitos de interesse, de forma a possibilitar sua determinação quali ou quantitativa por meio de uma técnica analítica adequada.

A extração em fase sólida (sigla em inglês, SPE) é uma técnica de separação que visa a remoção do(s) analito(s) da matriz, na qual as moléculas do analito se deslocam da matriz e interagem com o sorvente presente no cartucho de extração. Do ponto de vista prático, uma solução contendo o analito de interesse é colocada no topo

do cartucho e aspirada com pequeno vácuo de forma a penetrar no cartucho de extração. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito em concentração já apropriada para análise⁵⁰. Este processo pode ser considerado um simples processo cromatográfico, como o que ocorre em cromatografia líquida. O sorvente seria a fase estacionária e a fase móvel seria a água presente na amostra durante a etapa de extração e o solvente orgânico durante a etapa de eluição⁵¹.

A extração em fase sólida pode ser empregada para concentrar o analito antes da análise, para isolar o analito da matriz em que se encontra ou para estocagem do analito. A concentração do analito pode ser atingida passando um grande volume de amostra através do cartucho e eluindo o analito de interesse com pequena quantidade de solvente, de forma que o eluato esteja bem mais concentrado que a amostra original. Para isolamento de analito (*clean-up*) o objetivo principal não é o de concentrar a amostra, mas sim isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Isto pode ser obtido retendo-se o analito no sorvente e removendo os interferentes da matriz ou reter a matriz no sorvente e permitir que os analitos sejam coletados juntamente com o solvente da amostra. Nos casos onde o analito fica retido no sorvente, é possível realizar a concentração e o *clean-up* em um mesmo procedimento de extração. Existem casos onde a amostra encontra-se em local distante do laboratório analítico. Neste caso, a SPE pode ser utilizada para armazenar os analitos. Os cartuchos são levados ao local da amostra e procede-se à primeira etapa de extração que consiste em passar

⁵⁰ Lanças, F.M.; Extração em fase sólida (SPE), Ed. Rima, São Carlos, SP, 2004.

⁵¹ Holland P.T., McNaughton D.E., Malcolm C.P.; Multiresidue analysis of pesticides in wines by solid-phase extraction, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 79.

a amostra através do cartucho, de forma a reter os analitos de interesse. Após esta etapa, o cartucho é armazenado em baixas temperaturas e transportado até o laboratório analítico⁵⁰.

O procedimento de extração em fase sólida envolve basicamente quatro etapas:

a) Condicionamento do cartucho: esta etapa destina-se a ativar o material existente dentro do cartucho e o solvente a ser empregado depende principalmente o material a ser ativado. Um fator muito importante é impedir que o sorvente seque, para evitar a formação de caminhos preferenciais e comprometer a separação e a reprodutibilidade na extração.

b) Adição da amostra: a adição da amostra deve ser quantitativa e normalmente é feita com o auxílio de uma pipeta ou uma seringa. A velocidade de aplicação pode ser um fator crítico e idealmente deve ser lenta.

c) Remoção dos interferentes: esta etapa visa eliminar os interferentes com um solvente que não possua força suficiente para remover o analito de interesse do sorvente.

d) Eluição do analito: a eluição deve ser feita com um solvente que seja capaz de eluir os compostos de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior. O volume utilizado deve ser mínimo para que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para análise.

A técnica de SPE é utilizada principalmente com matrizes líquidas, embora haja trabalhos na literatura onde a SPE foi utilizada para concentrar e isolar analitos a partir de uma matriz gasosa⁵².

⁵² David F., Nikolai A., Sandra P.; Analysis of C10-C20 hydrocarbons in natural gas by solid phase extraction and CGC, *J. High Resol. Chromatogr.* 12 (2005) 657.

Há vários tipos de sorventes disponíveis comercialmente e sua escolha durante o desenvolvimento do método de extração depende das propriedades químicas dos analitos e da matriz. Para a remoção de compostos apolares de uma matriz aquosa, é necessário que o sorvente utilizado no cartucho de extração também possua caráter apolar.

Em nosso laboratório, sorventes obtidos pelo método de evaporação de solvente têm sido estudados^{53,54,55}.

Não há registro na literatura da utilização de cartuchos para extração em fase sólida baseados em sílica e polibutadieno. O fato de este polímero ser estável frente a solventes orgânicos e apresentar boa seletividade³⁷, o torna um material promissor para ser empregado em SPE.

⁵³ Maltez H.F., Melo L.F.C., Queiroz S.C.N., Jardim I.C.S.F., Curtius A.J., Carasek E.; A comparative study of homemade C18 and commercial C18 sorbents for preconcentration of lead by minicolumn solid phase extraction, *Mikrochimica Acta* 44 (2004) 17.

⁵⁴ Vigna C R.M., Morais L.S.R., Collins C.H., Jardim I.C.S.F.; Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 211.

⁵⁵ Faria A.M., Maldaner L., Santana C.C., Jardim I.C.S.F., Collins C.H.; Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters, *Anal. Chim. Acta* 582 (2006) 34.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um material baseado em polibutadieno e sílica, estudar o efeito da adição do peróxido de dicumila na estabilidade cromatográfica do material e avaliar seu desempenho como fase estacionária reversa em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FR) e como sorvente para extração em fase sólida (SPE). Para esta finalidade, foram seguidas as seguintes etapas:

- Otimizar as variáveis envolvidas na imobilização por tratamento térmico das fases estacionárias sorvidas, de forma a se obterem fases estacionárias com bons desempenhos cromatográficos ($N \geq 80\ 000$ para o composto mais retido na mistura teste, $R_s \geq 1,5$ e A_s entre 0,6 e 1,5 para compostos ácidos e neutros e A_s entre 0,6 e 2,0 para o composto básico da mistura teste.)
- Caracterizar as fases estacionárias obtidas através de testes físicos, químicos e cromatográficos.
- Avaliar a influência do agente de entrecruzamento na estabilidade química das fases estacionárias de polibutadieno através da passagem de fase móvel agressiva em colunas preparadas na presença e na ausência do peróxido de dicumila durante o processo de imobilização.
- Preparar e avaliar o desempenho de sorventes de polibutadieno e sílica, preparados nas condições otimizadas, frente à extração de agrotóxicos em uma amostra de vinho.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES

A sílica utilizada no preparo das fases estacionárias (PK-101-H3) e a fase estacionária C18 quimicamente ligada (PK-201-D3), ambas com diâmetro de partículas de 3 μm e tamanho de poros de 10 nm, foram adquiridas da Rainin Instrument. A sílica gel utilizada para preparo do sorvente para SPE (diâmetro de partículas de 35 a 70 μm e tamanho de poros de 6 nm) foi adquirida de Acros Organics. O polibutadieno ($M_n \sim 5000$) constituído de 20 % das unidades de 1,2 e 80 % de unidades 1,4-cis e 1,4-trans e peróxido de dicumila, 98 % foram adquiridos da Aldrich Chemical. A abertura do frasco de polibutadieno foi sempre realizada sob fluxo de nitrogênio. O naftaleno P.A. foi adquirido da Carlo Erba. O acenafteno, a uracila e o fenol, foram adquiridos da Aldrich Chemical; a N,N-dimetilanilina, da Fluka; o hexano 85 %, o metanol, a acetonitrila, o isopropanol e o acetato de etila, todos de grau HPLC, foram adquiridos da Tedia; o clorofórmio P.A., da Labsynth, o etanol PA, da Merck e o gás nitrogênio, da White Martins. A água deionizada foi obtida através do sistema Milli-Q, Millipore. Florisil (60-100 mesh) foi adquirido da Sigma-Aldrich. O vinho Juan Carrau, empregado para os ensaios de eficiência de extração na extração em fase sólida, foi produzido a partir de uma cultura orgânica proveniente de Caxias do Sul, RS, Brasil.

3.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador de frascos Marconi, modelo MA 161;
- Agitador magnético Fisatom, modelo 752;
- Balança analítica Fisher Scientific, modelo A-250;

- Balança microanalítica Sartorius, modelo CP225D;
- Banho ultrassom Thornton, modelo T14;
- Bomba de enchimento Haskel modelo 51769, com faixa de pressão de 6,9 a 344,7 MPa (1000 a 50000 psi);
- Cromatógrafo a líquido Waters, composto por uma bomba de alta pressão modelo 510 com detector espectrofotométrico de comprimento de onda variável modelo 486, injetor manual Rheodyne 7725i, alça amostradora de 5 μ L e sistema de aquisição de dados, software ChromPerfect, da Justice Innovations foi utilizado para avaliação das colunas cromatográficas;
- Cromatógrafo a líquido Waters, composto por um sistema controlador de solventes com sistema binário de bombas modelo 515, detector espectrofotométrico no ultravioleta e visível com arranjo de diodos (UV-vis DAD), modelo 996, injetor manual Rheodyne 7725i, alça amostradora de 10 μ L e sistema de aquisição de dados, software Millennium, da Waters foi utilizado para as análises após extração em fase sólida;
- Estufa Yamato, com sistema de vácuo, modelo ADP 21;
- Forno EDG com programação de temperatura, modelo EDG 10P-S;
- Furadeira de bancada Schulz modelo FSB;
- Porosímetro ASAP 2010, da Micromeritics Instruments;
- Sistema purificador de água, Millipore, modelo Milli-Q Plus ou Direct-Q;
- Analisador elementar Perkin-Elmer, modelo 2400;
- Calorímetro de varredura diferencial (DSC), TA Instruments, modelo DSC910;
- Analisador termogravimétrico (TGA), TA Instruments, modelo TGA2050;

- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier FTIR, Bomem, modelo DA8.

3.3. FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE

3.3.1. Preparo das Fases Estacionárias

A preparação das fases estacionárias foi realizada utilizando o método de evaporação de solvente, o qual já foi amplamente utilizado em outros trabalhos, mostrando ser um método fácil e eficiente para deposição do polímero na sílica.^{56,57,58}

Dois gramas de sílica foram secos em estufa a 140 °C por 24 h e mantidos em dessecador para resfriamento à temperatura ambiente. Uma solução de PBD em 10 mL de hexano foi deixada sob agitação magnética por 10 min. Em seguida, esta solução foi transferida para um béquer contendo a sílica e a mistura foi levada ao ultrassom por 10 min. O béquer foi tampado e mantido sob agitação magnética por 3 h. Após este período, adicionou-se a esta suspensão uma quantidade de peróxido de dicumila (PDC) já dissolvido em hexano a uma concentração de 0,05 % (m/v). A mistura foi levada ao ultrassom por mais 10 min e mantida sob agitação magnética por 1 h. Após este período, o béquer foi tampado com papel alumínio perfurado e levado à capela para

⁵⁶ Silva E.S.; Preparação de Fases Estacionárias para CLAE com uma Mistura de Poli(dimetilsiloxano) e Poli(metiloctadecilsiloxano) Sorvidos e Imobilizados por Tratamento Térmico sobre Sílica, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2007.

⁵⁷ Lourenço J.; Preparação de Fases Estacionárias de Dimetilmetilfenilsiloxano sobre Sílica, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.

⁵⁸ Vigna C. R. M.; Estudo do Efeito do Tratamento Térmico no Processo de Imobilização de Fases Estacionárias para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

evaporação total do solvente por um período de 6 dias. Todos os recipientes em que o polímero estava presente foram protegidos da luz com plástico negro.

Após os 6 dias de evaporação obtinha-se a fase sorvida. Este material foi então submetido ao processo de imobilização da fase líquida polimérica sobre o suporte de sílica através de tratamento térmico. Diferentes condições de tratamento térmico foram avaliadas. Após a imobilização, procedeu-se à remoção do excesso de polímero. Esta remoção foi feita utilizando-se uma bomba de alta pressão do cromatógrafo a líquido. Dois gramas da FE foram colocados em um reservatório de extração (160 mm de comprimento x 10 mm de diâmetro interno) e este foi conectado à bomba. Os solventes extratores utilizados foram o clorofórmio e o metanol, nesta seqüência, na vazão de 1,0 mL min⁻¹, por um período de 2 h para cada solvente. A FE foi então mantida em capela até evaporação total do solvente.

Para preparo da fase estacionária na ausência de PDC, o mesmo procedimento foi utilizado substituindo-se a solução de PDC pelo mesmo volume de hexano.

3.3.2. Enchimento das Colunas Cromatográficas

Após a remoção do excesso de polímero e secagem da FE, preparou-se uma suspensão a 10 % (m/v) da FE em clorofórmio (0,8 g de FE para 8 mL de clorofórmio). Foram preparadas duas suspensões de cada FE preparada, sendo estas colocadas em tubos de ensaio com tampa, recobertos com plástico negro e mantidos sob agitação por cerca de 16 h, até o momento do enchimento das colunas cromatográficas.

O corpo das colunas cromatográficas e as peças de conexão (Figura 8) foram confeccionados na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp. Estas foram feitas a partir de tubos de aço inoxidável 316, sem costura, trefilado. As colunas

possuem 60 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno. Nas extremidades, são encaixadas as seguintes peças de conexão: um tubo de alinhamento de 9 mm contendo anel com filtro; um redutor de 9 mm e uma porca terminal de 31 mm de comprimento.

A superfície interna da coluna cromatográfica precisa de um acabamento tipo “espelho” para minimizar fraturas das partículas que podem ocorrer durante o enchimento, na qual as partículas são forçadas contra a parede interna do tubo⁵⁹. Por esta razão, a superfície interna do tubo utilizado na confecção das colunas cromatográficas foi submetida a um processo de polimento, no qual uma haste de metal giratória fixada em uma furadeira de bancada e envolvida por palha de aço e pasta de polimento (Rubbing Compound, nº7) é passada através do interior do tubo de aço inoxidável. Este procedimento foi desenvolvido no LabCrom⁶⁰. O polimento foi efetuado até que nenhuma imperfeição fosse visualmente detectada na superfície interna dos tubos. Para posterior limpeza, os tubos foram mantidos por 15 h em ácido nítrico 50 % (v/v) e em seguida lavados com detergente e água deionizada.

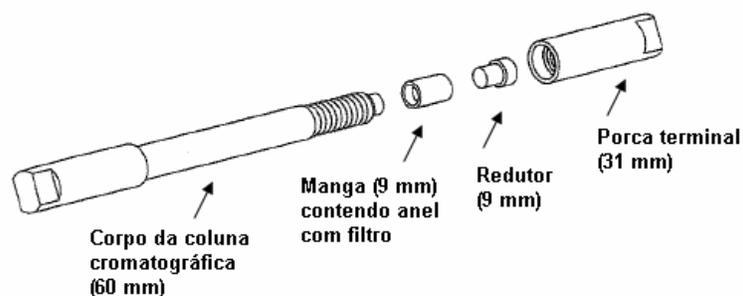


Figura 8: Esquema da coluna cromatográfica e suas conexões³⁸

⁵⁹ Kirkland J.J, DeStefano J.J.; The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 50.

⁶⁰ Collins K.E, Franchon, A.C., Jardim, I.C.S.F. Rodovanovic, E., Gonçalves, M.C.; The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance, *LC-GC* 16 (2000) 106.

Para o enchimento das colunas utilizou-se a bomba Haskel (Figura 9), na qual o reservatório de solvente é preenchido com o solvente propulsor, metanol, previamente filtrado. A válvula de gás nitrogênio é aberta e o sistema é pressurizado em uma pressão constante. Após conectar o tubo da coluna cromatográfica no reservatório de enchimento, transferiu-se a suspensão para este reservatório o qual foi completado com clorofórmio. Logo abaixo da coluna cromatográfica, colocou-se uma proveta, para medir o volume de solvente que passou através da coluna durante seu enchimento. Ao abrir a válvula da bomba Haskel, a pressão exercida pelo gás N₂ força a passagem do solvente pela FE, ficando esta retida por um filtro presente no final da coluna. O sistema foi mantido sob pressão (34,5 MPa ou 5000 psi) até a passagem de 80 mL de solvente. Após este volume, a válvula foi fechada e a coluna permaneceu conectada por 5 min. Em seguida o sistema foi despressurizado e a coluna, desconectada da linha.

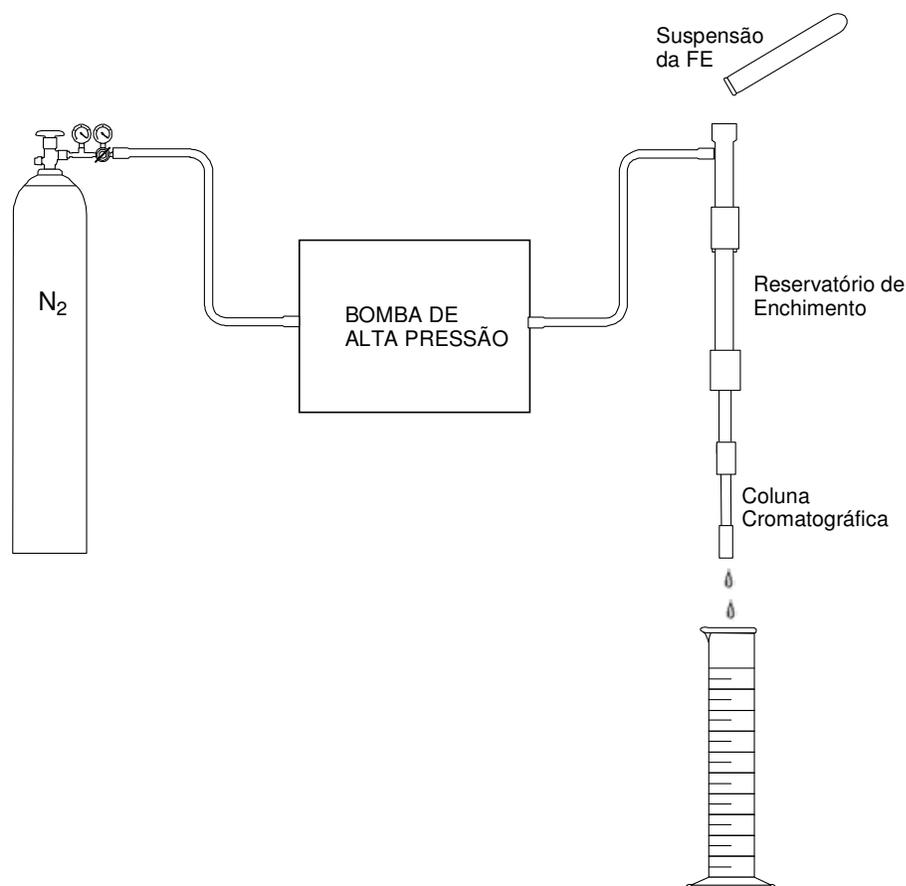


Figura 9: Esquema do sistema de enchimento das colunas

O excesso de FE no topo da coluna foi cuidadosamente removido com espátula e a coluna fechada com as conexões: tubo de alinhamento contendo anel com filtro, redutor de volume e porca terminal.

3.3.3. Preparo da Fase Móvel

Os volumes dos solventes que compõem a fase móvel foram medidos individualmente e misturados em seguida. As fases móveis foram então filtradas em membrana Durapore, 0,22 μm de porosidade, 47 mm de diâmetro (GVWP04700 – Millipore) para remoção de materiais particulados e foram desgaseificadas em

ultrassom por 30 minutos, antes da sua utilização. As fases móveis foram utilizadas por no máximo 10 dias da data de preparação.

3.3.4. Caracterização Cromatográfica das Fases Estacionárias

A avaliação cromatográfica foi realizada através da injeção de uma mistura teste contendo uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno (Figura 10). Esta mistura visa avaliar o comportamento das colunas frente à compostos ácidos e básicos, além dos compostos neutros. O composto uracila interage muito pouco com a fase estacionária e, portanto, foi utilizado para determinar o tempo de eluição de um composto não retido, t_M . As concentrações dos compostos da mistura teste variaram de uma coluna para outra. No entanto, não houve uma preocupação quantitativa; houve apenas um cuidado para que os picos apresentassem alturas semelhantes no cromatograma. A mistura dos compostos foi dissolvida na FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v), estocada em frasco âmbar com tampa sob refrigeração.

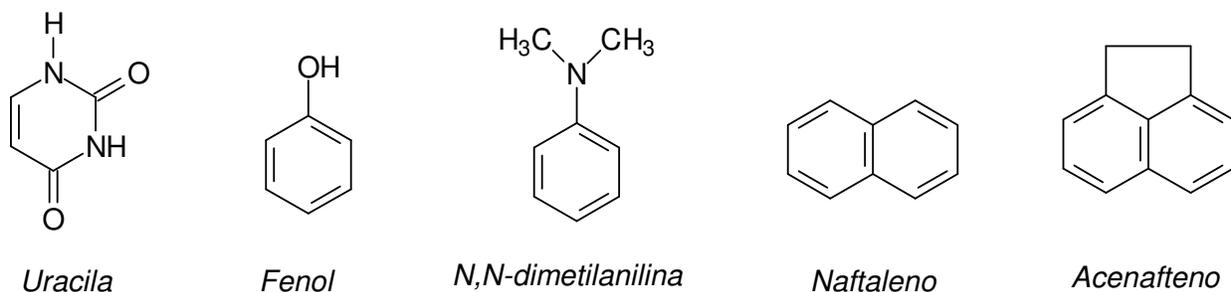


Figura 10: Componentes da mistura teste.

Antes das avaliações cromatográficas, as colunas foram condicionadas por aproximadamente 1 h com a FM MeOH: H₂O na proporção 70:30 (v/v), em uma vazão

de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, conectando a coluna à bomba do cromatógrafo a líquido, sem adaptar a sua extremidade de saída ao detector para evitar que pequenas partículas ou excesso de polímero pudessem obstruir a cela de detecção. O condicionamento das colunas é necessário para que ocorra um equilíbrio entre a FE e a FM prevenindo a falta de repetitividade dos tempos de retenção dos compostos eluídos.

Após o condicionamento, foram injetados $5 \mu\text{L}$ da mistura-teste, em triplicata. Para confirmação da identidade dos picos, foram feitas injeções individuais de cada componente da mistura teste.

O comprimento de onda do detector foi fixado em 254 nm e a vazão foi de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, definida após a obtenção de uma curva de van Deemter.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para caracterizar as colunas foram o tempo de retenção ajustado (t_R'), o fator de retenção (k), o fator de assimetria a 10 % da altura do pico (A_s), a resolução entre dois picos adjacentes (R_s) e a eficiência, em pratos por metro (N/m), obtidos com relação ao acenafteno. Estes parâmetros foram obtidos utilizando o software ChromPerfect.

3.3.5. Caracterização Física das Fases Estacionárias e da Sílica

3.3.5.1. Área superficial, Diâmetro médio e Volume específico de Poros

A sílica e algumas fases estacionárias foram caracterizadas através da área superficial, volume e tamanho de poros, calculados através das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K . Antes das medidas de sorção, as amostras foram degaseificadas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h sob vácuo de aproximadamente 15 mPa (10^{-4} torr). As análises das isotermas incluíram a avaliação da área de superfície específica de

acordo com o método BET⁶¹ dos dados de adsorção na faixa de pressão relativa (p/p_0) de 0,06 a 0,25, onde p e p_0 denotam as pressões de saturação e equilíbrio do nitrogênio a 77K, respectivamente. O volume de poros foi avaliado usando o método de ponto único⁶¹ pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro de poro médio foi determinado a partir do volume total de poro e área de superfície BET ($4V_p/S_{BET}$).

3.3.5.2. Porcentagem de carbono

A determinação da porcentagem de carbono de algumas fases estacionárias foi feita através da análise elementar. As análises foram feitas em duplicata e quando os resultados eram diferentes em mais de 0,4% de carbono entre si, uma terceira amostra era analisada para confirmação dos resultados. O resultado final foi obtido da média de todas as análises.

3.3.5.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho de algumas fases estacionárias e sorventes foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram preparadas sob forma de pastilhas com KBr.

3.3.6. Caracterização Física do Polibutadieno

Para caracterização do polibutadieno, quatro frações de uma amostra do polímero foram separadas. A primeira foi caracterizada tal qual. As demais frações foram individualmente solubilizadas em hexano e mantidas sob agitação magnética

⁶¹ Gregg S.J., Sing K.S.W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2ª ed., Academic Press, London, (1982).

por 3 h. Após este período, adicionou-se à duas das três frações restantes uma solução de peróxido de dicumila (PDC) em hexano (0,05 % m/v) de forma a obter concentrações de 2,5% e 5,0% m/m PDC/PBD. A mistura foi levada ao ultrassom por 10 min e mantida sob agitação magnética por 1 h. Após este período, o béquer foi tampado com papel alumínio perfurado e levado à capela para evaporação total do solvente por um período de 6 dias. Todos os recipientes em que o polímero estava presente foram protegidos da luz com plástico negro. Após os 6 dias de evaporação as três frações foram submetidas ao tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C em estufa. Este procedimento visou simular as condições as quais o PBD é submetido durante o preparo das FE. As amostras resultantes foram então caracterizadas por TGA e DSC.

3.3.6.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Os termogramas foram obtidos utilizando aproximadamente 10 mg de amostra e velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹ no intervalo de 25 a 700 °C. As análises foram realizadas sob atmosfera oxidante.

3.3.6.2. Calorimetria Diferencial por Varredura (DSC)

As análises de DSC foram feitas na tentativa de evidenciar o grau de entrecruzamento das cadeias de polibutadieno, através da obtenção da temperatura de transição vítrea, T_g. A varredura foi feita de -120 a 250 °C.

3.3.7. Teste de Estabilidade das Fases Estacionárias

Com o objetivo de comparar a estabilidade das FE preparadas na presença e ausência de peróxido, realizou-se o teste em condições drásticas: fase móvel alcalina MeOH : tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0 (4,8 mmol L⁻¹ Na₂CO₃ + 95,2 mmol L⁻¹ NaHCO₃) 60:40 (v/v), vazão 0,4 mL min⁻¹ a 40 °C. Este procedimento foi desenvolvido no Labcrom⁶². As avaliações cromatográficas foram realizadas nas mesmas condições de fase móvel, vazão e temperatura, sendo feitas injeções da mistura teste a cada 30 minutos. O valor de eficiência (N/m) para o pico de acenafteno foi monitorado durante a realização dos testes. O teste foi concluído com a diminuição de 50% do valor de eficiência inicial.

3.4. Sorventes para Extração em Fase Sólida

3.4.1. Preparo dos Sorventes

Os sorventes foram preparados da mesma forma que descrito no item 3.3.1, com diferença na massa de sílica utilizada para cada lote preparado, que foi de 8 g.

3.4.2. Preparo dos Cartuchos de SPE

Foram transferidos 500 mg do sorvente de sílica/PBD, imobilizado com tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de mais 4 h a 160 °C, para uma seringa de 3 mL de polipropileno, sendo este material retido por dois filtros de polietileno com porosidade de 20 µm (Figura 11).

⁶² Fonseca D.A., Gutiérrez H.R., Collins K.E., Collins C.H.; Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 149.

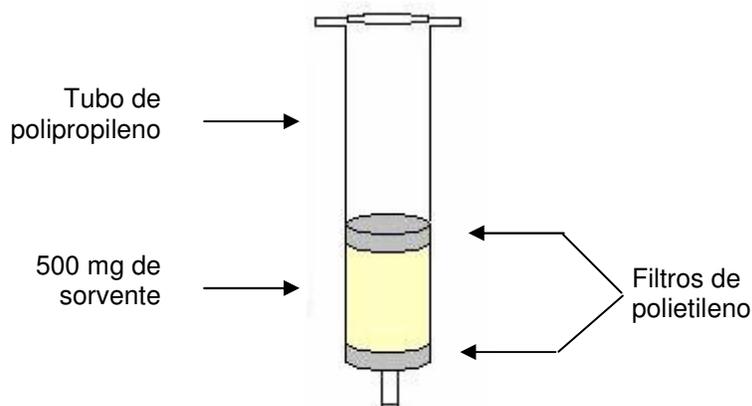


Figura 11: Cartucho de extração em fase sólida

3.4.3. Preparo das Soluções Padrão de Agrotóxicos

Soluções individuais de três agrotóxicos comumente empregados na cultura de uva foram preparadas na concentração de 1 g L^{-1} . Diurom e carbaril foram preparados em acetonitrila, enquanto que simazina foi preparada em etanol. Estas soluções foram estocadas ao abrigo da luz a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Soluções padrão de trabalho ($0,10$; $0,40$; $0,70$; $1,0$; $1,26$; $1,50 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas no dia da análise, usando uma solução estoque de 20 mg L^{-1} contendo os três agrotóxicos em acetonitrila.

3.4.4. Processo de Extração

As extrações foram efetuadas em um sistema de extração em fase sólida Supelco Visiprep SPE Vacuum Manifold. Os cartuchos de PBD foram condicionados com 3 mL de metanol e 3 mL de água Milli-Q. Percolou-se através dos cartuchos o volume de 5 mL de vinho (condição otimizada) fortificado ou não, com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de cada agrotóxico, a uma vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Em seguida, passou-se através dos cartuchos 3 mL de isopropanol $0,6 \%$ (v/v). Os cartuchos foram secos, sob vácuo, por

20 min. Com o objetivo de isolar os analitos de interesse dos interferentes da matriz (*Clean-up*), os cartuchos de PBD foram acoplados em cartuchos de florisil (Figura 12), previamente preparados no laboratório e lavados com 3 mL de acetato de etila. Procedeu-se então à eluição dos componentes retidos, também na vazão de 0,7 mL/min, com 3 mL de acetato de etila. O eluente foi concentrado até a secura sob fluxo de nitrogênio e redissolvido em 1 mL de acetonitrila. Em seguida, os extratos foram analisados por cromatografia líquida. Este procedimento foi adaptado de um método desenvolvido no laboratório e não publicado.

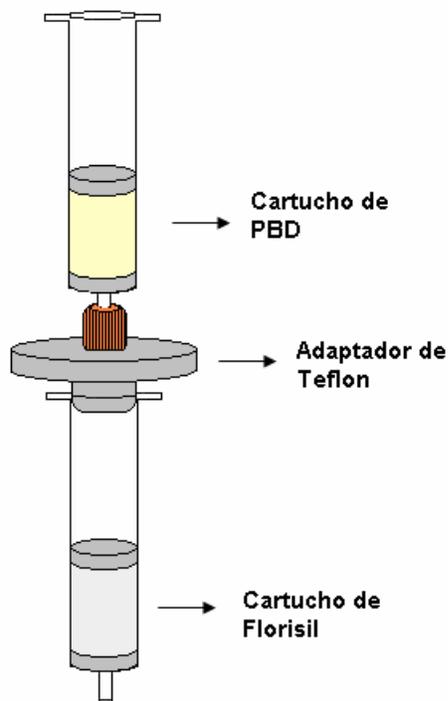


Figura 12: Acoplamento do cartucho de PBD ao cartucho de florisil durante a etapa de eluição dos agrotóxicos

3.4.5. Análise Cromatográfica dos Extratos

A análise dos extratos foi efetuada no modo de eluição por gradiente, com programação linear, utilizando como fase móvel acetonitrila:água, a uma vazão de 1 mL min⁻¹. Iniciou-se com 20 % de acetonitrila e 80 % de água até 50 % de acetonitrila e 50 % de água em 25 min, voltando às condições iniciais em 5 min, com um tempo total de corrida cromatográfica de 30 min. A coluna utilizada foi uma Nova-Pak C18 (3,9 mm d.i. x 150 mm), 4 µm de diâmetro de partícula, da Waters. A detecção foi feita em 210 nm para diurom e 220 nm para simazina e carbaril e o volume de injeção foi de 10 µL.

3.4.6. Avaliação dos resultados

A quantificação dos extratos foi feita utilizando a equação da reta de curvas analíticas de cada um dos três agrotóxicos em seis níveis de concentração 0,10; 0,40; 0,70; 1,00; 1,26 e 1,50 mg L⁻¹. A eficiência de extração foi calculada conforme equação 14.

$$\% \text{ Eficiência de Extração} = \frac{C_{\text{obtida}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

Sendo que,

$$C_{\text{teórica}} = C_{\text{fortificação}} \times \text{FPC} \quad \text{Eq. 15}$$

O FC (fator de concentração) consiste do número de vezes que a amostra é concentrada, ou seja, o volume inicial de amostra dividido pelo volume de amostra após a extração (solução de análise). Neste trabalho, o FC = 5 e, portanto, a concentração esperada ($C_{\text{teórica}}$) = 1,0 mg L⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO DA FASE ESTACIONÁRIA

4.1.1. Pressão de Enchimento

A pressão utilizada para enchimento das colunas cromatográficas é uma das muitas variáveis que afetam a qualidade do recheio e, portanto, o desempenho da coluna⁶³. No LabCrom, as condições de enchimento já estão bem estabelecidas para partículas de 5 µm. Foi necessário verificar se a pressão utilizada para recheiar colunas com partículas de 5 µm (34,5 MPa) seria adequada para as partículas de 3 µm. Foram realizados diversos enchimentos de uma FE comercial C18, 3 µm, com 34,5 MPa e 48,3 MPa. Os resultados de dois deles encontram-se na Figura 13 e Tabela I.

Pode-se observar que a diferença de desempenho entre as colunas recheadas sob 34,5 MPa e 48,3 MPa foi pequena e, por isso, optou-se por continuar empregando a pressão de 34,5 MPa.

⁶³ Verzele, M., Dewaele C.; Low-viscosity solvent packing of HPLC columns using the 'up-tube' packing procedure, *LC-GC* 4 (1986) 614.

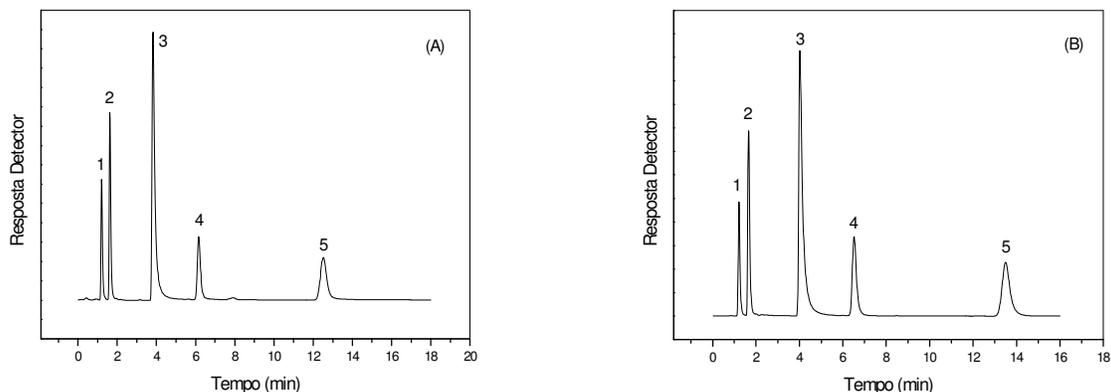


Figura 13: Cromatogramas obtidos com colunas recheadas com uma FE comercial C18 de 3 μm de diâmetro de partícula sob pressão de 34,5 MPa (A) e 48,3 MPa (B). Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm

Tabela I: Parâmetros cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com uma FE comercial C18 de 3 μm de diâmetro de partícula sob pressão de 34,5 MPa e 48,3 MPa.

Pressão de Enchimento	Parâmetros Cromatográficos*				
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m ⁻¹)	As^{**}	Rs^{***}
34,5 MPa	12,5	9,4	116 900	1,4	8,2
48,3 MPa	13,5	10,1	109 000	1,5	6,5

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Um dos grandes desafios deste trabalho foi obter colunas com recheios uniformes e, por isso, sempre foram recheadas no mínimo duas colunas de cada FE. Se os valores fossem muito discrepantes, outra coluna era recheada e, por isso, os resultados apresentados representam a média das injeções da melhor coluna obtida para cada fase estacionária.

4.1.2. FE sorvida

A FE sorvida, isto é, que não foi submetida a qualquer processo de imobilização do polímero sobre o suporte de sílica, foi preparada para conhecer o seu desempenho cromatográfico e comparar com as fases preparadas na presença de peróxido e imobilizadas por tratamento térmico (TT). Para o preparo desta FE, após a evaporação do solvente por 6 dias, procedeu-se à extração do excesso de polímero conforme descrito no item 3.3.1.

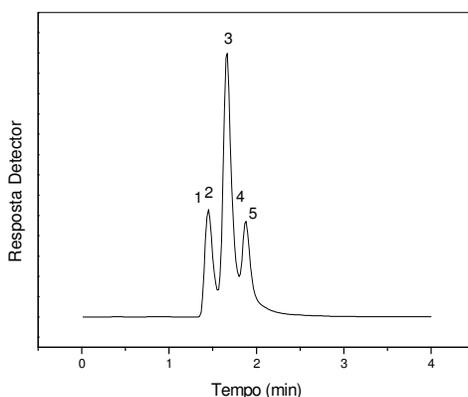


Figura 14: Cromatograma obtido com coluna recheada com FE sorvida (40 % de PBD). Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm

A carga de polímero (40% m/m) e período de tempo para sorção do polímero (6 dias), foram otimizados anteriormente em um trabalho desenvolvido no LabCrom³⁸ e, a partir deste estudo, esta FE foi preparada e avaliada. A FE com PBD simplesmente sorvida na superfície da sílica, ou seja, preparada sem a utilização de peróxido e tratamento térmico não resolveu os compostos da mistura teste (Figura 14). Possivelmente, o polímero foi arrastado do suporte de sílica durante a extração do excesso de polímero e/ou durante o enchimento das colunas por não se aderir em uma

quantidade suficiente para obtenção de um material com características adequadas de fase estacionária reversa, evidenciando a importância do processo de imobilização na obtenção da FE com polibutadieno.

Lopes³⁸ obteve resultados semelhantes aos apresentados acima quando utilizou frascos de PBD abertos há no máximo 1 mês ou 3 meses do dia do preparo das FE sorvidas. No entanto, ao utilizar um frasco de polibutadieno aberto há 6 meses do dia do preparo, foram obtidas colunas com bom desempenho cromatográfico, apresentando eficiência próxima de 80 000 pratos m^{-1} . Moraes³⁹ também obteve bons resultados com a FE sorvida, tanto no uso do suporte de sílica quanto no suporte de sílica titanizada, com eficiências próximas de 40 000 e 70 000 pratos m^{-1} . Ambos trabalhos utilizaram sílicas de procedências diferentes da usada neste trabalho, com tamanhos de partícula de 5 μm , e portanto, a distribuição do polímero sobre a superfície da sílica deve ter sido diferente. Sabe-se que a quantidade de polímero sorvido na superfície da sílica é dependente da natureza da sílica, ou seja, das propriedades estruturais, como volume, diâmetro e forma de poros, área superficial, concentração de metais em sua estrutura e concentração dos silanóis. Por exemplo, Bottoli⁶⁴ mostrou que a sílica Rainin e a sílica Kromasil apresentam características estruturais muito diferentes em vários aspectos citados anteriormente e, desta forma, a sílica Rainin mostrou que, com 5 dias, metade do polímero adicionado ficou irreversivelmente adsorvido, enquanto que a sílica Kromasil necessitou de 70 dias para adsorver 20% do polímero adicionado.

⁶⁴ 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.

4.1.3. FE imobilizada por tratamento térmico na presença de peróxido

4.1.3.1. Determinação da carga de PBD

Com a finalidade de determinar qual a melhor quantidade de PBD a ser depositada sobre as partículas da sílica usada neste trabalho, foram avaliadas as FE preparadas com as cargas de 5, 10, 20, 30 e 40 % (m/m) na presença de 2,5 % de PDC (m/m PDC/PBD). O tratamento térmico utilizado foi de 1 h a 120 °C seguido de mais 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante. Os resultados cromatográficos estão apresentados na Figura 15 e na Tabela II. A FE que apresentou melhor desempenho cromatográfico, apesar de a uracila ter praticamente co-eluído com o fenol, foi aquela preparada com 10 % de PBD, resultando em uma eficiência de 81.000 N/m para o composto mais retido e boa resolução cromatográfica de todos os compostos da mistura teste. A FE preparada com 5 % de PBD apresentou baixa resolução e o tempo de retenção do composto N,N-dimetilanilina não foi constante entre as replicatas. Isto pode ser explicado pelas fortes interações do tipo troca-iônica, que ocorrem entre os solutos básicos, como a N,N-dimetilanilina e os grupos silanóis residuais da sílica⁶⁵, indicando que a carga de 5 % de PBD não foi suficiente para o recobrimento do suporte de sílica. A baixa resolução dos picos apresentada por esta FE impediu o cálculo dos parâmetros cromatográficos. As FE preparadas com 20 e 30 % de PBD apresentaram valores de eficiência semelhantes entre si e inferiores à FE com 10 % de PBD. Esta redução da eficiência deve ter sido provocada pela diminuição da cinética de transferência de massa dentro da coluna em

⁶⁵ Yang X., Dai J., Carr P.W.; Analysis and critical comparison of the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 13.

virtude da maior quantidade de polímero depositada no interior dos poros⁶⁶. A FE preparada com 40 %, devido ao excesso de PBD, formou grumos durante a suspensão, acarretando entupimento dos filtros e impedindo o enchimento da coluna.

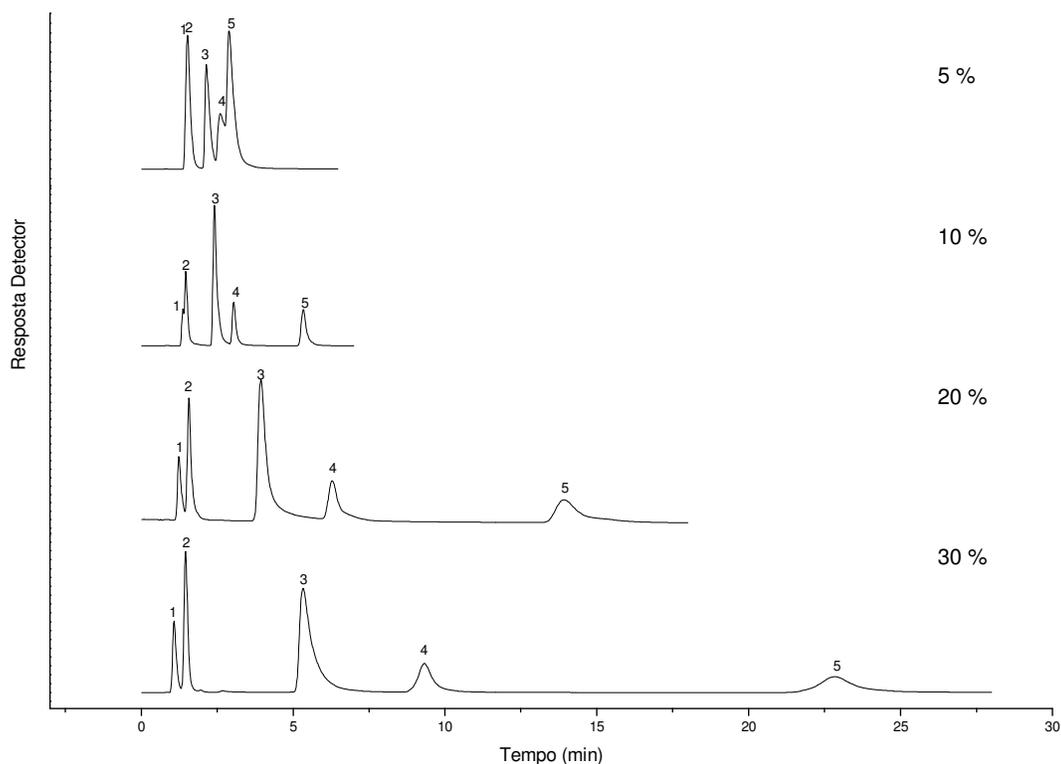


Figura 15: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com diferentes porcentagens de carga de PBD sobre sílica, imobilizadas sob TT de 1 h a 120 °C seguido de mais 4 h a 160 °C. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

⁶⁶ Reeder D.H., Li J., Carr P.W., Flickinger M.C., McCormick A.V.; Models for polybutadiene pore wall coatings in porous zirconia, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 71.

Tabela II: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE preparadas com diferentes porcentagens de carga de PBD sobre sílica.

Carga de PBD (%)	Parâmetros Cromatográficos*				
	t_R *** (min)	k **	N ** (m^{-1})	As **	Rs ***
5	1,4	0,9	-	-	-
10	4,1	3,3	81 000	2,2	8,3
20	12,7	10,2	30 500	3,5	8,7
30	21,8	20,1	36 100	1,7	9,9

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

4.1.3.2. Caracterização das Fases Estacionárias

Características estruturais foram determinadas para a sílica Rainin e FE preparadas com diferentes porcentagens de PBD e encontram-se na Tabela III:

Conforme esperado, ocorre uma diminuição da área superficial e do volume específico de poro dos materiais conforme a carga de polímero é aumentada. Estes resultados avaliados em conjunto com os parâmetros cromatográficos da Tabela III confirmam o efeito cumulativo da cobertura do suporte.

Tabela III: Valores de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros da sílica Rainin e das FE obtidas com diferentes cargas de PBD (resultados obtidos com as FE extraídas e antes do enchimento das colunas).

Material	Área Superficial (m ² g ⁻¹)	Volume Específico de Poro (mL g ⁻¹)	Tamanho médio de poro (nm)
Sílica nua	180,1	0,512	11,4
FE 5 %	143,6	0,437	12,2
FE 10 %	123,4	0,363	11,8
FE 20 %	61,5	0,193	12,6
FE 30 %	16,0	0,057	14,2
FE 40 %	1,6	0,002	4,5

4.1.3.3. Estudo do Tratamento Térmico

Novos lotes da FE foram preparados com a carga de polímero que apresentou o melhor desempenho cromatográfico, ou seja, preparada com 10 % de PBD e submetidos a diferentes condições de tratamento térmico, a fim de avaliar as melhores condições de entrecruzamento polimérico. Além da temperatura e duração do aquecimento, a atmosfera em que o tratamento térmico é realizado pode influenciar o entrecruzamento do polibutadieno, uma vez que alguns estudos têm mostrado que o polibutadieno é sensível ao oxigênio⁶⁷.

Os tratamentos avaliados foram:

- a) 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante;
- b) 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera inerte;
- c) 4 h a 100 °C sob atmosfera oxidante;
- d) 8 h a 160 °C sob atmosfera oxidante.

⁶⁷ Lopes N.P., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Influence of air on polybutadiene used in the preparation of stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 231.

Estes resultados estão mostrados na Figura 16 e os parâmetros cromatográficos na Tabela IV. Analisando os cromatogramas, verifica-se que há uma grande atividade silanofílica na FE quando a atmosfera inerte é utilizada, caracterizada pela acentuada deformação do pico cromatográfico da N,N-dimetilanilina da mistura teste. Além disso, a porcentagem de carbono é inferior àquela obtida em atmosfera oxidante. Estes resultados mostraram que a imobilização térmica sob atmosfera oxidante foi mais adequada para esta FE, provavelmente devido ao melhor entrecruzamento do PBD e recobrimento dos sítios ativos da sílica, obtendo uma FE mais eficiente.

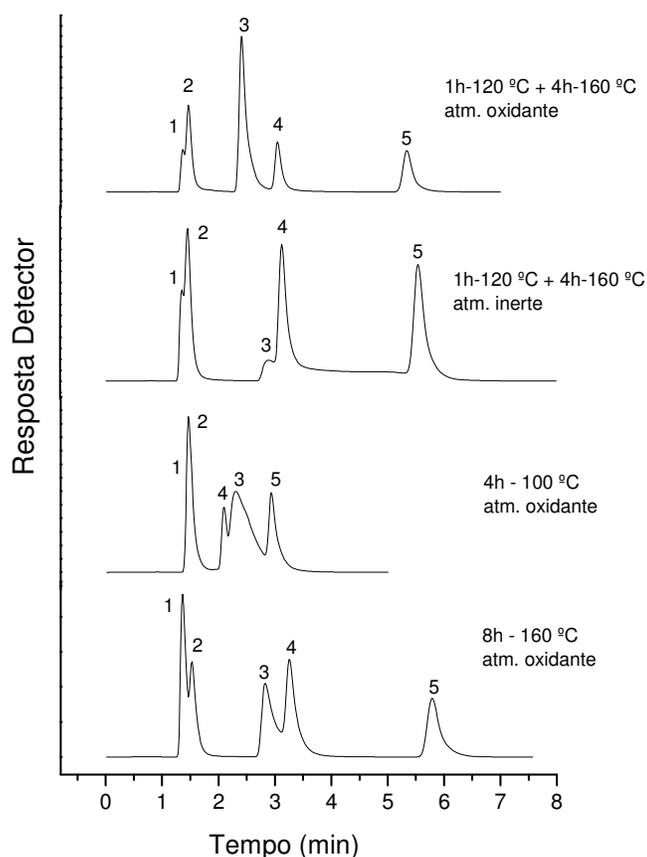


Figura 16: Cromatogramas das FE obtidas através de diferentes condições de temperatura, tempo e atmosfera do tratamento térmico. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

Tabela IV: Parâmetros cromatográficos e porcentagem de carbono das FE obtidas através de diferentes condições de temperatura, tempo e atmosfera do tratamento térmico.

Tratamento Térmico	Parâmetros Cromatográficos*					
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m^{-1})	As^{**}	Rs^{***}	% C****
a) 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C sob atm. oxid	4,1	3,3	81 000	2,2	8,3	8,4
b) 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C sob atm. inerte.	4,2	3,1	63 200	2,5	8,0	7,4
c) 4 h a 100 °C sob atmosfera oxidante;	1,5	1,0	-	-	-	3,5
d) 8 h a 160 °C sob atmosfera oxidante	4,4	3,2	54 900	2,4	7,3	-

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

**** Obtida após a extração do excesso de polímero.

O tratamento (c), 4 h a 100 °C, foi avaliado porque o peróxido de dicumila inicia a sua decomposição a 88 °C. Logo, seria esperado que a temperatura de 100 °C fosse suficiente para promover a decomposição térmica do peróxido, gerando os radicais responsáveis pelo entrecruzamento do polímero. Além disso, esperava-se que a temperatura mais baixa (aquecimento brando) reduziria eventual degradação térmica do polibutadieno. Entretanto, isto não foi confirmado. A FE preparada sob este tratamento se mostrou inadequada para separação dos componentes da mistura teste, com baixa resolução dos picos, o que impediu o cálculo dos parâmetros cromatográficos. O comportamento apresentado por esta FE sugere que a presença de radicais não é por si só suficiente para promover a imobilização do polímero. A função do calor neste caso, não é apenas a geração de radicais a partir do peróxido, mas também participar ativamente do entrecruzamento. O tratamento (d), 8 h a 160 °C

resultou em eficiência inferior à obtida no tratamento (a) indicando que um período longo em maiores temperaturas é prejudicial em termos de eficiência cromatográfica.

Analisando os espectros de infravermelho das FE preparadas sob os diferentes tratamentos térmicos (Figura 17), observa-se que não há diferenças significativas entre as bandas apresentadas por elas. A maioria dos sinais observados é característica ou da sílica ou do PBD. A banda em torno de 3450 cm^{-1} corresponde às vibrações dos grupos hidroxila ligados por ligações de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e também aos grupos hidroxilas vicinais e geminais. As bandas em torno de 1115 cm^{-1} e 980 cm^{-1} são atribuídas aos grupos siloxano e aos silanóis livres, respectivamente. A banda em 1640 cm^{-1} pode ser atribuída à absorção de moléculas de água. A incorporação do PBD pode ser comprovada através do aparecimento da banda em torno de 2930 cm^{-1} , que é característica do estiramento C-H das duplas ligações do PBD. Vale destacar a ausência das bandas em 910 e 960 cm^{-1} que são características dos estiramentos δ -CH=CH₂- das unidades 1,2 e unidades 1,4-cis, respectivamente. Como o entrecruzamento ocorre através destes grupos, a ausência destas bandas nos espectros das FE confirma o processo de entrecruzamento do PBD.

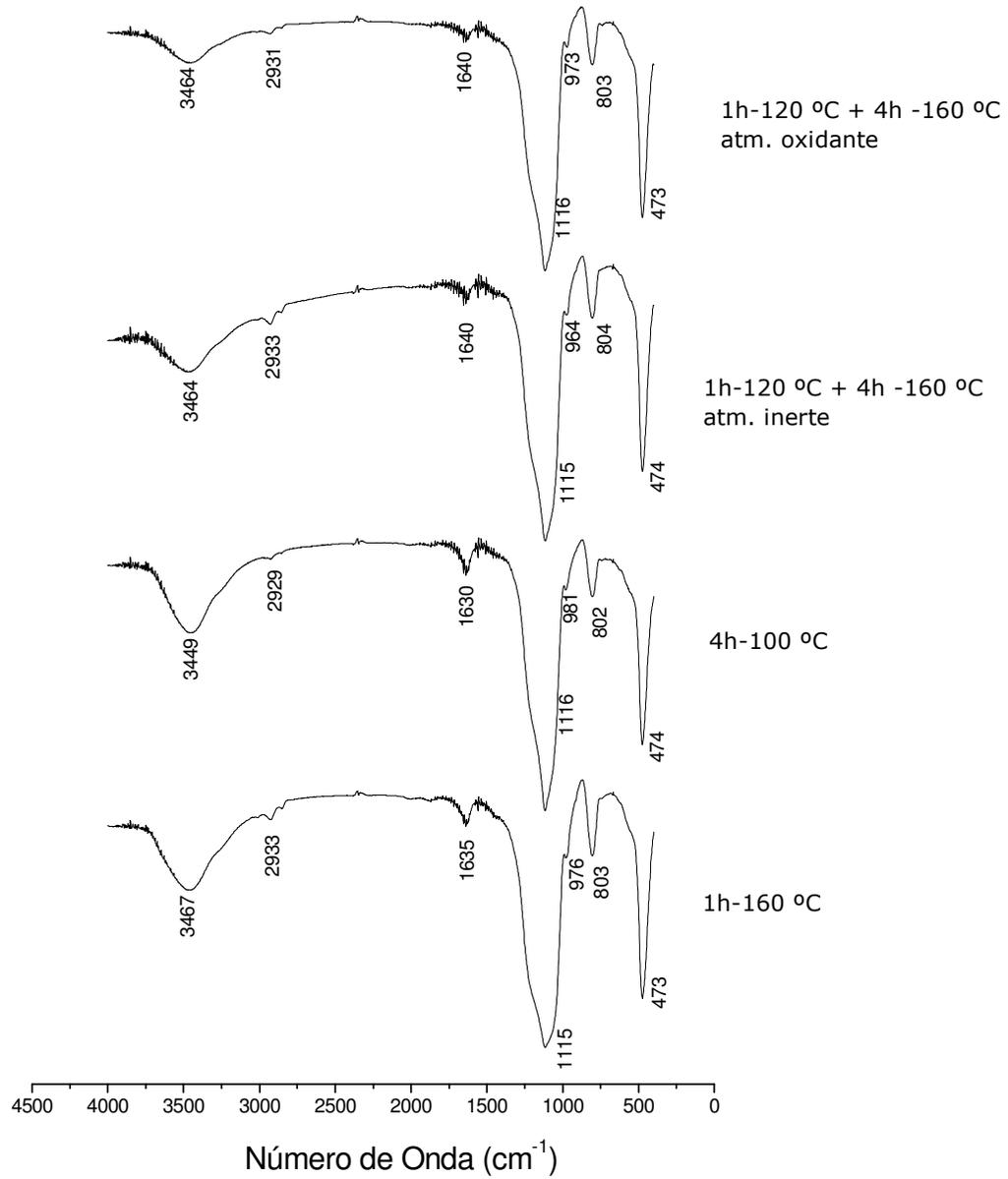


Figura 17: Espectros no infravermelho das FE preparadas com diferentes tratamentos térmicos.

4.1.3.4. Estudo da quantidade de peróxido

Como o tratamento térmico brando (100 °C) não proporcionou colunas com bom desempenho cromatográfico, mesmo sendo suficiente para gerar radicais, decidiu-se verificar o que ocorreria com uma FE imobilizada por tratamento térmico sem peróxido. Preparou-se uma FE com 10 % de polibutadieno sobre sílica, sem adição de peróxido, imobilizada por tratamento térmico por 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C. Também foi preparada uma FE contendo 5 % (m/m) PDC/PBD, ou seja, com maior concentração de peróxido. Os resultados das FE preparadas encontram-se na Figura 18 e na Tabela V.

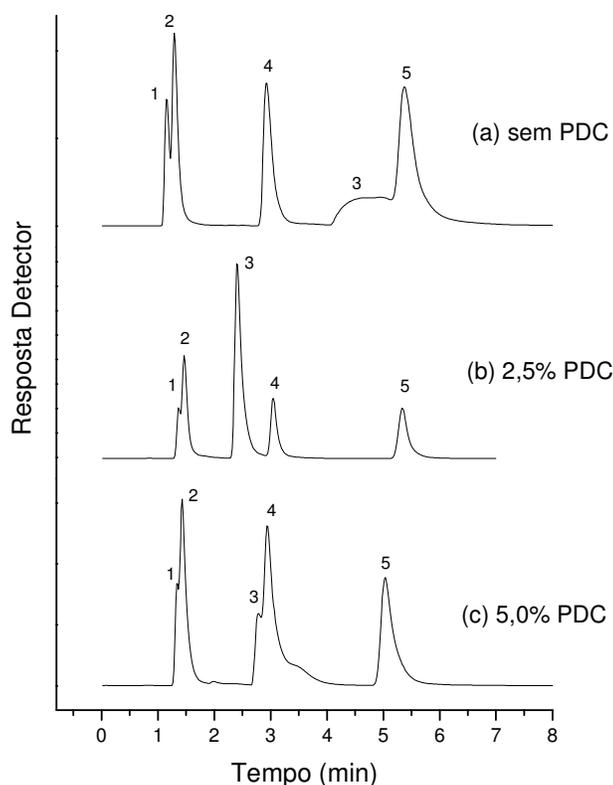


Figura 18: Cromatograma obtido com colunas das FE preparadas com 10 % de PBD sobre sílica, imobilizada sob TT de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante (a) na ausência de peróxido, (b) na presença de 2,5 % de peróxido (m/m PDC/PBD) e (c) na presença de 5,0 % de peróxido (m/m PDC/PBD) Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno.

Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

Tabela V: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE preparadas com 10 % de PBD sobre sílica, imobilizada sob tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C, na ausência de peróxido, na presença de 2,5 % e de 5 % de peróxido (m/m PDC/PBD).

%PDC	Parâmetros Cromatográficos*				
	t _R ^{***} (min)	k ^{**}	N ^{**} (m ⁻¹)	As ^{**}	Rs ^{***}
0,0	5,0	3,7	47 900	2,4	-
2,5	4,1	3,3	81 000	2,2	8,3
5,0	3,7	3,8	43 700	2,9	5,6

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Observa-se que na ausência de PDC, a FE obtida não foi adequada para eluir o composto básico, N,N-dimetilanilina, exibindo pico arredondado, provavelmente devido à cobertura insuficiente dos grupos silanóis residuais. Isto mostra a importância do peróxido no processo de entrecruzamento do polímero para obtenção de um recobrimento mais eficiente do suporte de sílica e, conseqüentemente para obtenção de colunas adequadas na separação de compostos básicos. Por outro lado, um aumento na quantidade de peróxido levou a uma FE com menor eficiência. Provavelmente uma maior quantidade de peróxido leva a um alto grau de entrecruzamento das cadeias poliméricas sobre o suporte de sílica, o que leva à diminuição da cinética de transferência de massa dentro da coluna e, conseqüentemente, redução da eficiência da coluna.

No trabalho realizado por Lopes³⁸, obteve-se FE adequadas na ausência de peróxido. Nas condições otimizadas, foram obtidas colunas com eficiência próxima de 100 000 pratos por metro e assimetria 1,1 para o naftaleno. No entanto, não foi possível comparar o desempenho frente ao composto básico, uma vez que as misturas testes utilizadas por Lopes continham apenas solutos neutros.

Lopes *et al*⁶⁸ compararam duas fases estacionárias quanto à estabilidade química, na presença e na ausência de peróxido durante o tratamento térmico e observaram que a eficiência das colunas preparadas na presença de peróxido foi é quase 70% inferior àquela obtida com FE preparadas na ausência do peróxido. Por outro lado, a FE preparada com peróxido apresentou uma estabilidade química muito superior, evidenciada pela porcentagem de carbono que permaneceu praticamente constante entre o início e o fim do teste (20 000 mL de fase móvel neutra MeOH:H₂O 70:30 v/v), enquanto que houve uma queda de quase 20% da porcentagem de carbono quando o mesmo teste de estabilidade foi feito em uma FE preparada na ausência de peróxido.

4.1.3.5. Reprodutibilidade de preparo da FE

Para avaliar a reprodutibilidade de preparo da fase estacionária que proporcionou os melhores resultados, outros três lotes foram preparados 7, 15 e 22 meses após o preparo do primeiro lote da fase otimizada (descrita no item 4.1.3.1). Esta abordagem foi considerada devido aos resultados obtidos por Lopes *et al*⁶⁷, que

⁶⁸ Lopes N.P., Morais L.S.R., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Efeito do agente de entrecruzamento na estabilidade química de fase estacionária baseada em sílica e polibutadieno para CLAE-FR, 27^a Reunião Anual da SBQ, 2004, Poços de Caldas – MG.

mostraram que o PBD se altera no frasco ao longo do tempo, após a primeira abertura do frasco.

Mesmo tomando-se os cuidados para evitar o contato do polímero com o ar durante seu manuseio (vidro aberto sob purga de N₂), foi constatado que o polímero sofreu alteração ao longo do desenvolvimento deste trabalho (Figura 19, Tabela VI).

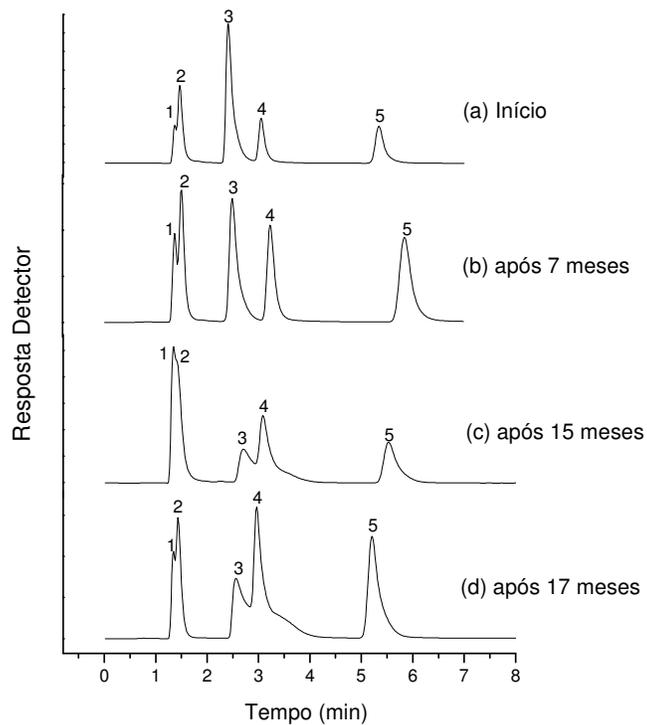


Figura 19: Estudo da reprodutividade de preparo da FE otimizada (10 % PBD, 2,5 % PDC, TT: 1 h a 120° + 4 h a 160 °C, atm. oxidante). (a) FE preparada no início do trabalho, (b) após 7 meses, (c) após 15 meses e (d) após 17 meses do início do trabalho. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

Tabela VI: Parâmetros cromatográficos da FE otimizada (10 % PBD, 2,5 % PDC, TT: 1 h a 120^o + 4 h a 160 °C, atm. oxidante) encontrados para 4 lotes preparados em tempos distintos: (a) FE preparada no início do trabalho, (b) após 7 meses, (c) após 15 meses e (d) após 17 meses do início do trabalho.

Lotes preparados	Parâmetros Cromatográficos*				
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m ⁻¹)	As^{**}	Rs^{***}
(a) início do trabalho	4,1	3,3	81 000	2,2	8,3
(b) após 7 meses	4,4	3,3	50 500	1,8	7,8
(c) após 15 meses	4,2	3,1	37 600	2,5	6,0
(d) após 17 meses	4,1	3,1	42 600	1,9	6,2

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Como há um visível aumento da viscosidade do polímero com o passar do tempo, atribuiu-se inicialmente as alterações do comportamento cromatográfico ao entrecruzamento das cadeias poliméricas no frasco de estocagem. Deve-se ressaltar que o frasco de PBD utilizado no início do trabalho já estava aberto. Se o PBD realmente estivesse entrecruzando no frasco de estocagem, este aumento da viscosidade poderia prejudicar a sua distribuição sobre a superfície da sílica, deixando uma maior quantidade de silanóis expostos, o que explicaria o comportamento inconveniente do composto básico avaliado. Além disso, o tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de mais 4 h a 160 °C (que foi adequado no início do trabalho) poderia levar agora a um grau de entrecruzamento excessivo a ponto de afetar a transferência de massa e reduzir a eficiência da coluna. Para verificar esta hipótese, avaliou-se um tratamento térmico por um período mais curto (1 h a 160 °C), de forma que o entrecruzamento da FE resultante fosse similar ao encontrado no início do trabalho.

Este menor período de aquecimento resultou em uma FE muito similar à preparada no início do trabalho com 1 h + 4 h de tratamento térmico, ou seja, oito meses após a otimização do tratamento térmico, foi necessário um período de aquecimento menor para se obter uma FE com eficiência cromatográfica similar (Figura 20, Tabela VII). Este resultado é uma forte indicação de que o polímero realmente sofreu entrecruzamento no frasco de estocagem.

Os demais tratamentos térmicos estudados no item 4.1.3.1 foram realizados em períodos próximos, permitindo a comparação dos resultados.

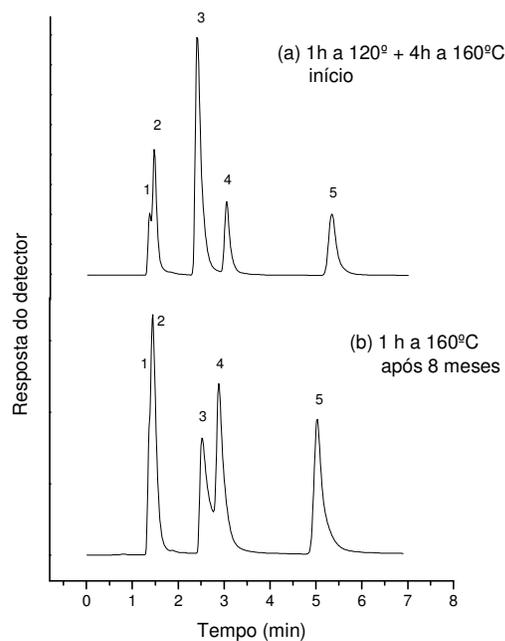


Figura 20: Evidência de entrecruzamento do PBD no frasco de estocagem: comparação de FE preparadas com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob os tratamentos térmicos (a) 1 h a 120^o + 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante preparada no início do trabalho e (b) 1 h a 160 °C preparada após 8 meses do início do trabalho. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

Tabela VII: Parâmetros cromatográficos de FE preparadas com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob os tratamentos térmicos (a) 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C preparada no início do trabalho e (b) 1 h a 160 °C preparada após 8 meses do início do trabalho.

Tratamento Térmico/PBD	Parâmetros Cromatográficos*					
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m^{-1})	As^{**}	Rs^{***}	% C****
1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C Início	4,1	3,3	81 000	2,2	8,3	8,4
1 h a 160 °C Após 8 meses	3,6	2,4	69 500	2,8	7,6	6,5

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

**** Obtida após extração do excesso de polímero.

4.1.3.6. Modificação da Fase móvel

O emprego de fases móveis modificadas pode conferir uma melhora dos parâmetros cromatográficos pela supressão de interações do tipo troca-iônica que ocorre entre os analitos e grupos silanóis residuais. Desta forma, uma coluna (preparada com o tratamento térmico de 1 h a 160 °C), foi testada com diferentes fases móveis.

Como pode ser verificado na Tabela VIII e na Figura 21, é possível uma melhora significativa do desempenho da coluna, inclusive em relação ao composto básico pelo emprego de fases móveis tamponadas. Com o tampão fosfato pH 7,0 a assimetria da N,N-dimetilanilina chega a valores de 1,4, que é um desempenho superior a muitas colunas comerciais com fases quimicamente ligadas.

Tabela VIII: Parâmetros cromatográficos de FE avaliada com diferentes fases móveis.

Fase Móvel (MeOH 50%)	Parâmetros Cromatográficos*					
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m^{-1})	As^{**}	As^{***}	Rs^{****}
H ₂ O pH 3,0	26,5	14,5	97 100	1,8	-	17,7
H ₂ O pH 4,0	25,2	13,8	95 500	1,8	2,2	19,1
H ₂ O pH 6,0	24,7	13,5	75 300	2,0	4,5	15,2
H ₂ O pH 8,0	27,3	14,8	38 900	2,1	-	10,4
Tampão fosfato pH 2,7	26,8	18,4	81 600	1,6	3,5	15,9
Tampão fosfato pH 7,0	24,4	16,6	64 153	1,0	1,4	14,2

* Os valores representam a média de 3 injeções

** Calculado para o acenafteno.

*** Calculado para N,N-dimetilanilina

**** Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Os pH foram modificados com ácido ortofosfórico ou hidróxido de amônio.

O comportamento do composto básico foi bastante afetado pelo pH da fase móvel. Em pH menor que 4,0, a N,N-dimetilanilina ($pK_a = 5,1$) que se encontra na forma ionizada, apresentou acentuada variação do tempo de retenção entre as injeções, possivelmente devido a interações secundárias (troca-iônica) com silanóis residuais da superfície da sílica. Quando é utilizada uma fase móvel tamponada há uma estabilização no tempo de retenção deste composto. Em pH maior que 6,0, a N,N-dimetilanilina encontra-se na forma molecular e, conforme esperado, apresentou uma maior interação com a fase estacionária.

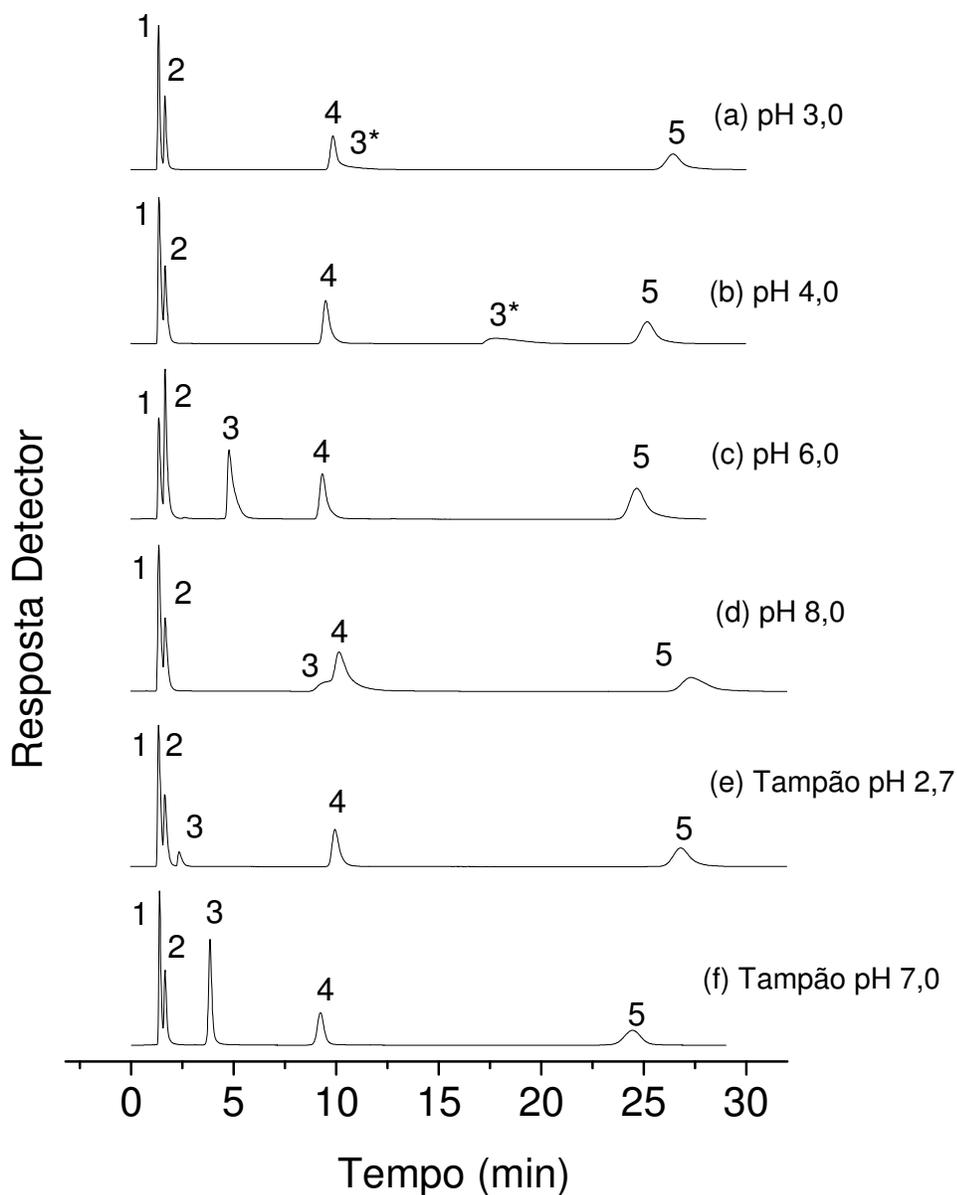


Figura 21: Variação da fase móvel na avaliação cromatográfica da coluna preparada com 10 % PBD, 2,5 % PDC sob tratamento térmico de 1 h a 160 °C. (a) MeOH : H₂O pH 3,0 50:50 v/v; (b) MeOH : H₂O pH 4,0 50:50 v/v; (c) MeOH : H₂O pH 6,0 50:50 v/v; (d) MeOH : H₂O pH 8,0 50:50 v/v; (e) MeOH : Tampão fosfato pH 2,7 - 50:50 v/v; (f) MeOH : Tampão fosfato pH 7,0 - 50:50 v/v. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafeno. Condições cromatográficas: vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

*Variação no tempo de retenção do composto básico.

4.1.3.7. Comparação entre frascos de PBD

Ao se constatar a modificação do PBD no frasco, mesmo tomando-se cuidado para evitar contato com oxigênio e luz, foi avaliado o comportamento do PBD proveniente de um frasco sem qualquer contato prévio com O₂. Para isto, um novo frasco de PBD foi adquirido. Este novo frasco foi manipulado sob fluxo constante de N₂ e foi chamado de PBD(0). O frasco utilizado desde o início do trabalho já estava aberto por um tempo não-definido. Sendo assim, X meses representa há quanto tempo o frasco de PBD estaria aberto quando o trabalho foi iniciado. Este frasco foi utilizado para comparação e, como estava aberto há X+17 meses, foi chamado de PBD(X+17). Os resultados encontram-se na Figura 22 e Tabela IX.

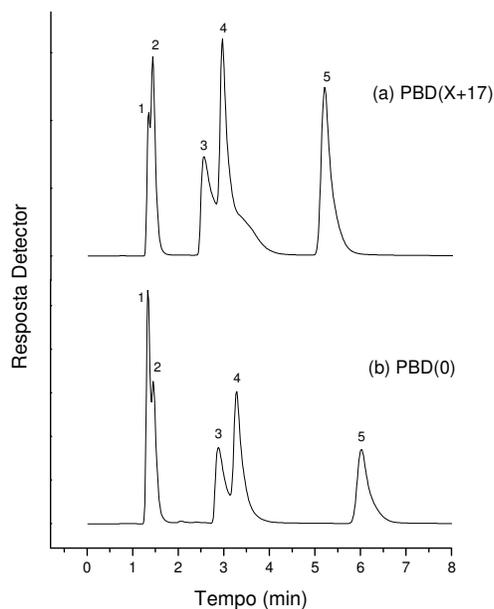


Figura 22: Cromatogramas das FE preparadas (a) com um PBD proveniente de frasco aberto a pelo menos 17 meses, PBD(X+17) e (b) com um PBD proveniente de frasco aberto no dia do preparo, PBD(0), ambos preparados com 10 % de PBD, 2,5% de PDC e imobilizados por tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C. Mistura teste: 1-uracil; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafeno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção UV, 254 nm.

Tabela IX: Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas com FE preparadas com um PBD proveniente de frasco aberto a pelo menos 17 meses, PBD(X+17) e com um PBD proveniente de frasco aberto no dia do preparo, PBD(0).

PBD	Parâmetros Cromatográficos*				
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m^{-1})	As^{**}	Rs^{***}
PBD (X+17)	4,1	3,1	42 600	1,9	6,2
PBD (0)	4,5	3,3	43 200	2,0	6,8

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Os resultados não revelaram significantes diferenças no comportamento cromatográfico entre as FE preparadas com PBD recém aberto e outro com mais de 17 meses de uso. Porém, a alta atividade silanofílica frente ao composto básico de ambas as fases estacionárias pode ser devida à motivos diferentes: no caso do PBD(X+17) a alta viscosidade apresentada pelo polímero, característica de entrecruzamento, pode ter dificultado a sua distribuição e, conseqüentemente o recobrimento da superfície da sílica. Já o PBD(0) por não ter sofrido um entrecruzamento prévio no frasco de estocagem, pode não ter sido suficientemente imobilizado na superfície da sílica durante o tratamento térmico e, durante a etapa de enchimento ou avaliação cromatográfica, parte do polímero pode ter sido eluída, deixando mais grupos silanóis expostos.

Como o frasco contendo o PBD(X+17), que era proveniente do mesmo frasco utilizado no início do trabalho (e proporcionou o melhor desempenho cromatográfico, com eficiência de 81 000 pratos), já estava aberto antes do início do trabalho, especula-se que algum pré-entrecruzamento no frasco de estocagem é requerido para obtenção de fases estacionárias com desempenho cromatográfico satisfatório.

4.1.3.8. Caracterização do PBD

Como o grau de polimerização do PBD é um fator crítico para a obtenção de FE de boa qualidade, procurou-se medir a massa molar do polímero antes e após o entrecruzamento das cadeias poliméricas, na presença e na ausência de peróxido de dicumila. Na primeira tentativa, utilizou-se cromatografia de permeação em gel. No entanto, as amostras tratadas termicamente na presença de peróxido tornaram-se insolúveis em vários solventes, impossibilitando sua análise. As amostras de PBD puro e tratado termicamente na ausência de peróxido puderam ser solubilizadas, mas o cromatograma de GPC revelou uma banda bastante alargada e de baixa intensidade (provavelmente parte da amostra ficou retida no filtro da coluna), afetando o resultado quantitativo.

Na tentativa de evidenciar o efeito do peróxido de dicumila no grau de entrecruzamento das cadeias poliméricas, foi realizada uma análise de DSC (Figura 23). É esperado que quanto maior o entrecruzamento, maior é a temperatura de transição vítrea, T_g . Houve um ligeiro aumento da T_g com o aumento da porcentagem de peróxido em relação ao PBD, indicando que o grau de entrecruzamento das cadeias aumenta com calor e com a presença de peróxido.

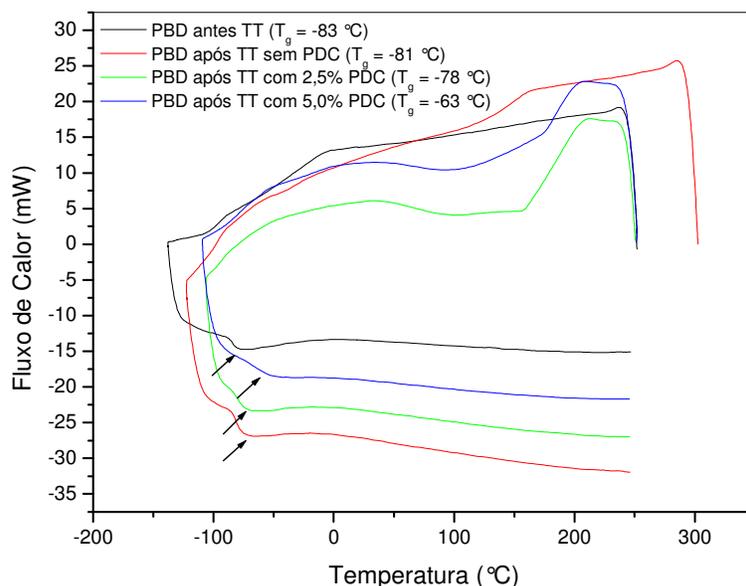


Figura 23: Termogramas de DSC obtidos com o PBD submetido a diferentes tratamentos.

A Figura 24 mostra os termogramas obtidos para as amostras de polibutadieno antes do tratamento térmico, após tratamento térmico na ausência de peróxido, após tratamento térmico na presença de 2,5% de peróxido e na presença de 5% de peróxido. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de perda de massa em função da temperatura. A temperatura de degradação do PBD foi de aproximadamente 430 °C independente do tratamento aplicado.

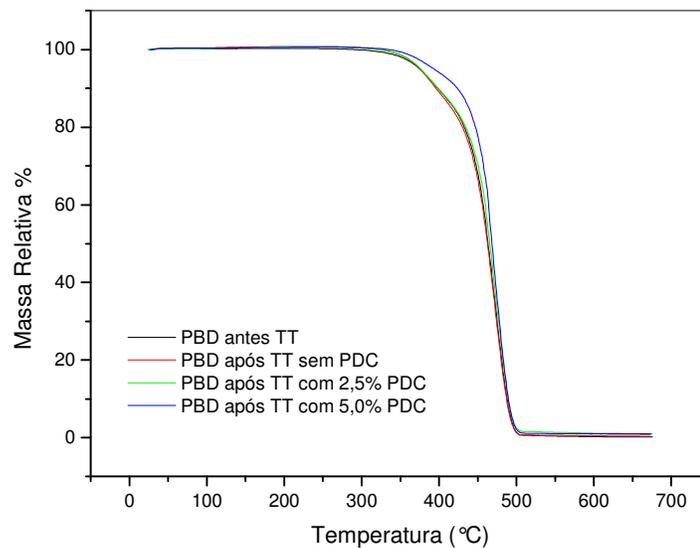


Figura 24: Análise termogravimétrica do PBD em diferentes tratamentos

4.1.3.9. Variação do suporte cromatográfico

Uma vez que o recobrimento dos silanóis pela camada orgânica apolar nem sempre alcança toda a superfície do suporte, a acidez dos grupos silanóis torna-se fundamental na qualidade do suporte cromatográfico. A maioria das sílicas utilizadas em cromatografia não é pura¹², devido à fonte de sílica sol a partir da qual elas são preparadas. A maioria das sílicas é sintetizada a partir de sílica sol obtida pela acidificação do silicato de sódio sob condições controladas. Os silicatos de sódio são normalmente preparados pela dissolução de areia em hidróxido de sódio. Assim, a sílica resultante normalmente contém significantes níveis de impurezas, sendo a maioria metais e alumina. Além disso, o hidróxido de sódio utilizado também apresenta muitas vezes traços de metais pesados, que podem ser concentrados na sílica sol em virtude do caráter de troca iônica dos grupos silanóis¹². Uma vez que a sílica é obtida, a

remoção destas impurezas é bastante difícil, pois as impurezas são oclusas na matriz da sílica. Portanto é imperativo que a sílica seja preparada com reagentes cuidadosamente purificados.

Os metais eventualmente incorporados à matriz da sílica conferem uma alta acidez aos silanóis residentes nos átomos de silício adjacentes, tendo como resultado uma forte adsorção de analitos de caráter básico.

Para avaliar se seria o PBD ou o tipo de sílica usada neste trabalho que estariam afetando o comportamento do composto básico na coluna, foram comparadas duas FE preparadas com sílicas diferentes: uma com sílica Rainin (utilizada durante todo o trabalho) e outra com sílica Kromasil (5 μm), de maior pureza que a sílica Rainin. Ambas FE foram preparadas com 2,5 % de PDC (m/m PDC/PBD), 10 % PBD (m/m) no mesmo estágio de envelhecimento (as FE foram preparadas em semanas consecutivas) e imobilização térmica de 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante. Os resultados podem ser vistos na Figura 25 e Tabela X .

Avaliando-se a FE preparada com a sílica Kromasil, nota-se que o pico cromatográfico da N,N-dimetilanilina foi resolvido em relação ao naftaleno e com uma menor interação com os grupos silanóis da sílica. Esta é uma importante indicação de que além da condição (tempo de cura) do polímero, as características do suporte cromatográfico também afetam a qualidade da FE.

Quando se compara a FE preparada com sílica Kromasil e polibutadieno com fases preparadas com esta mesma sílica e polissiloxanos^{69,70}, verifica-se que a

⁶⁹ Tonhi E., Collins K.E., Collins C.H.; High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 135.

eficiência obtida com polibutadieno é muito menor. Durante todo o trabalho, não foram obtidas colunas com eficiências maiores que 81.000 pratos/metro, empregando partículas de 3 μm , sendo que o esperado seriam eficiências acima de 100.000 pratos/metro, valores próximos das fases estacionárias quimicamente ligadas (Tabela I). Valores de eficiência na faixa de 80.000 pratos/metro são normalmente obtidas com partículas de 5 μm para os polissiloxanos. Isto indica que o polibutadieno tem desvantagens no uso como fase estacionária no modo fase reversa, quando comparado com os polissiloxanos, pois além de serem obtidas colunas com eficiências menores, o polímero é susceptível a alterações químicas que afetam a reprodutibilidade de preparo.

Tabela X: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com dois diferentes suportes cromatográficos, sílicas Rainin (3 μm) e Kromasil (5 μm), preparadas sob as mesmas condições: 10 % PBD (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante.

Sílica	Parâmetros Cromatográficos*				
	t_R *** (min)	k **	N ** (m^{-1})	A_s **	R_s ***
Rainin (3 μm)	4,1	3,1	42 600	1,9	6,2
Kromasil (5 μm)	3,4	2,2	26 800	2,2	5,3

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

⁷⁰ Faria A.M., Collins K.E., Collins C.H.; New stationary phases for high-performance liquid chromatography based on poly(methyltetradecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 114.

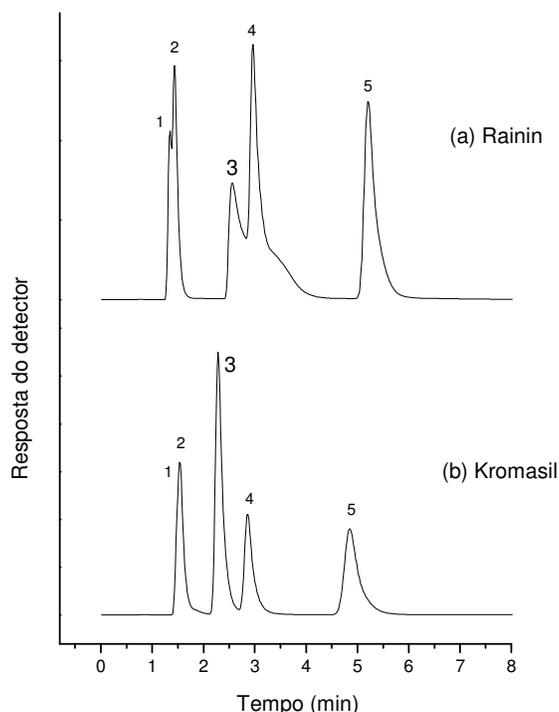


Figura 25: Comparação das FE preparadas com suportes cromatográficos diferentes, sílicas (a) Rainin (3 μm) e (b) sílica Kromasil (5 μm) preparadas sob as mesmas condições. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 μL; detecção UV, 254 nm.

4.1.3.10. Repetitividade de preparo da FE

Após as considerações anteriores sobre a FE de polibutadieno, mais uma hipótese foi considerada. As alterações encontradas entre as FE preparadas ao longo do tempo estariam associadas à degradação do polímero ou simplesmente a falta de repetitividade de preparo? Para responder esta questão, foram preparados simultaneamente dois lotes de FE (mesmo dia, sob as mesmas condições) e as colunas, avaliadas. Foi utilizado o polímero do frasco PBD(0). Os resultados estão mostrados na Figura 26 e Tabela XI.

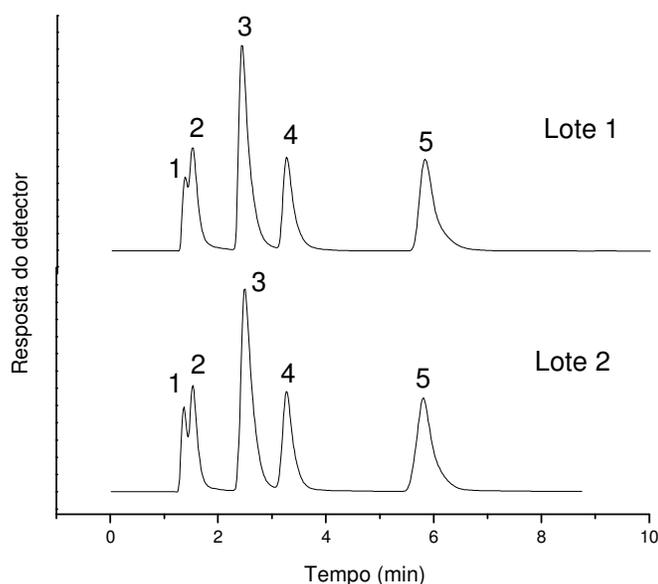


Figura 26: Comparação entre dois lotes de FE preparados simultaneamente utilizando a sílica Rainin (3 μm), 10 % PBD (0) (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 $^{\circ}\text{C}$ seguida de 4 h a 160 $^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera oxidante. Mistura teste: 1-uracila; 2-fenol; 3-N,N-dimetilanilina; 4-naftaleno; 5-acenafteno. Condições cromatográficas: FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v); vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 μL ; detecção UV, 254 nm.

Tabela XI: Parâmetros cromatográficos de dois lotes de FE preparados simultaneamente utilizando a sílica Rainin (3 μm), 10 % PBD (0) (m/m), 2,5 % PDC (m/m PDC/PBD) e imobilização térmica por 1 h a 120 $^{\circ}\text{C}$ seguida de 4 h a 160 $^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera oxidante.

Lote	Parâmetros Cromatográficos*					
	t_R^{***} (min)	k^{**}	N^{**} (m ⁻¹)	As^{**}	As^{***}	Rs^{****}
1	5,8	3,2	44 100	2,8	2,7	6,7
2	5,8	3,3	30 600	2,4	1,9	5,8

* Os valores representam a média de 3 injeções da melhor coluna obtida.

**Calculado para o acenafteno.

***Calculado para a N,N-dimetilanilina

****Calculado para o par naftaleno-acenafteno.

Os cromatogramas mostraram que o preparo pode ser reprodutível, pois o perfil cromatográfico foi muito semelhante e, realmente, as alterações percebidas ao longo do trabalho são devidas às alterações físico-químicas sofridas pelo polímero.

4.1.3.11. Teste de Estabilidade

O teste de estabilidade química é empregado para avaliar o tempo de vida útil da FE em função do volume de FM fluindo através da coluna. Para acelerar este estudo, foi utilizada uma condição drástica, uma vez que em condições normais de uso, este teste consumiria muito tempo, além de um gasto excessivo de fase móvel. A condição, embora não reflita condições usuais de análises, serve para a comparação quanto à estabilidade de FE distintas.

Duas fases estacionárias, preparadas na presença ou na ausência de peróxido, ambas obtidas com 10 % PBD (m/m) e imobilização térmica por 1 h a 120 °C seguida de 4 h a 160 °C sob atmosfera oxidante, foram comparadas quanto à estabilidade frente a uma fase móvel alcalina. Os resultados estão mostrados na Figura 27 e mostram que a presença de peróxido no preparo torna a FE mais estável, ou seja, o entrecruzamento obtido com o auxílio do peróxido protege a sílica por mais tempo contra a dissolução pela fase móvel alcalina. É possível perceber que sem peróxido, a eficiência da coluna é reduzida a 60% do valor inicial após 50 volumes de coluna (V_c) (~ 35 mL de fase móvel alcalina), enquanto que a FE com peróxido teve uma queda de apenas 20% do valor inicial após 180 volumes de coluna (~ 126 mL de fase móvel alcalina). Os valores de V_c foram calculados de acordo com a equação 16:

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad \text{Eq. 16}$$

onde r = raio da coluna (mm) e L = comprimento da coluna (mm).

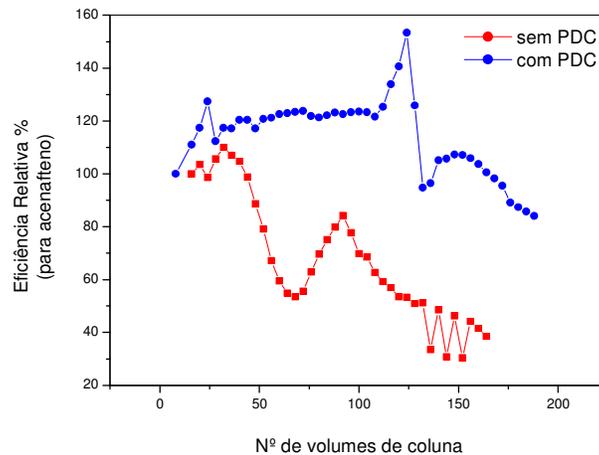


Figura 27: Efeito do peróxido na estabilidade da FE preparada com 10 % de PBD (m/m), imobilizada com 1 h a 120 °C + 4 h a 160 °C, atmosfera oxidante. Condições cromatográficas: FM 60:40 (v/v) MeOH:tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ (4,8 mmol L⁻¹ Na₂CO₃ + 95,2 mmol L⁻¹ NaHCO₃) pH 9,0; vazão de 0,4 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 10 µL; detecção UV, 254 nm. $V_c = 0,7$ mL

Situação semelhante foi observada por Fonseca D.A.⁷¹ que comparou FE comerciais com uma FE preparada no laboratório a base de PMOS obtida pelo método de evaporação de solvente. Em condições também drásticas (fase móvel alcalina MeOH/NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH, pH 10,1 (50:50 v/v), vazão 1,2 mL min⁻¹) foi observado que houve uma redução de 50% da eficiência inicial logo nos primeiros 50 mL de fase móvel alcalina, indicando que a estabilidade química da coluna preparada é inferior àquelas FE comerciais, onde a queda de 50% da eficiência inicial ocorreu apenas após a passagem de 300 mL (para a coluna comercial menos estável dentre as

⁷¹ 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.

estudadas). De acordo com os resultados obtidos neste mesmo trabalho, o gasto de 250 mL de fase móvel alcalina equivaleria a 6 meses de uso, caso a coluna fosse utilizada em condições brandas.

Mesmo a coluna de PBD tendo sido inferior em termos de estabilidade, comparada com a FE a base de PMOS e FE comerciais, o emprego de PDC elevou em no mínimo 3 vezes a estabilidade química da FE a base de PBD. Este resultado é bastante promissor e merece ser investigado em outros tipos de polímero.

4.2. AVALIAÇÃO DO SORVENTE DE PBD/SÍLICA PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).

Devido às características de fase reversa apresentadas pelo material baseado em PBD e sílica, decidiu-se verificar qual seria o desempenho deste material quando utilizado como sorvente para extração em fase sólida. O vinho foi escolhido como amostra teste por tratar-se de uma matriz complexa e os agrotóxicos simazina, carbaril e diurom foram selecionados por serem comumente empregados na cultura de uva. Estes agrotóxicos, devido às suas características químicas, apresentam retenção com sorventes apolares e comumente são extraídos com sorventes do tipo C18^{51,72,73}.

Desta maneira, o polibutadieno imobilizado na sílica apresenta características adequadas para extração destes agrotóxicos. A Figura 28 mostra a estrutura química da carbaril, simazina e diurom.

⁷² Wong J.W., Halverson C.A.; Multiresidue analysis of pesticides in wine using C-18 solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1999) 435.

⁷³ Deger A.B., Gremm T.J., Frimmel F.H.; Problems and solutions in pesticide analysis using solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography ion-trap mass spectrometry detection (CG-MS), *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 28 (2000) 292.

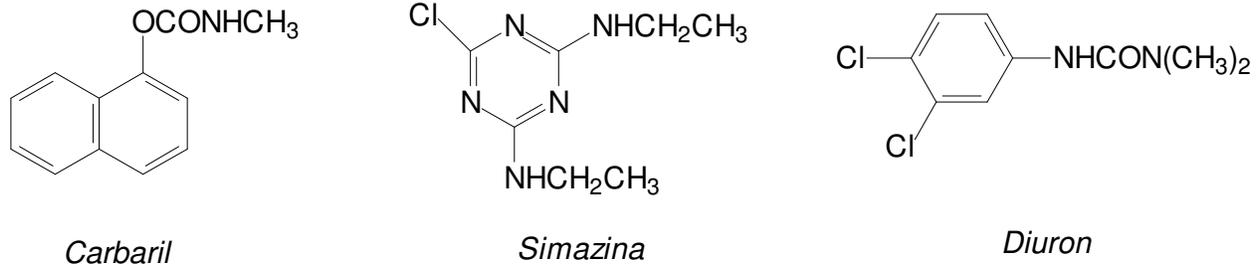


Figura 28: Estrutura química dos agrotóxicos carbaril, simazina e diuron.

É preciso ressaltar que este estudo não teve o objetivo de desenvolver ou validar um método de análise, mas sim mostrar que o material pode ser usado como sorvente para SPE.

4.2.1. Determinação do volume de amostra a ser extraído

Diversas variáveis experimentais podem afetar a eficiência de extração por SPE, como o solvente de condicionamento, a velocidade de percolação, propriedades físico-químicas da amostra, tempo de secagem dos cartuchos, solvente de eluição e principalmente, o volume de *breakthrough*⁷⁴, que é o volume de amostra que excede a capacidade de retenção do sorvente, resultando na perda de analito.

Desta forma, o primeiro parâmetro avaliado foi o volume de amostra a ser empregado. Para isto, foram percolados através dos cartuchos os volumes 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mL de vinho, fortificados com 0,40; 0,20; 0,13; 0,10 e 0,08 mg L⁻¹ de cada agrotóxico, respectivamente, e as eficiências de extração foram monitoradas (Figura 29). O sorvente utilizado neste ensaio foi preparado com 20% de PBD (m/m), 2,5%

⁷⁴ Poole C.F., Gunatilleka A. D., Sethuraman R.; Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 17.

PDC (m/m PDC/PBD) e tratamento térmico de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C. As fortificações com os agrotóxicos nas amostras foram feitas de modo que a concentração final do eluato permanecesse constante, independente do volume de amostra percolado.

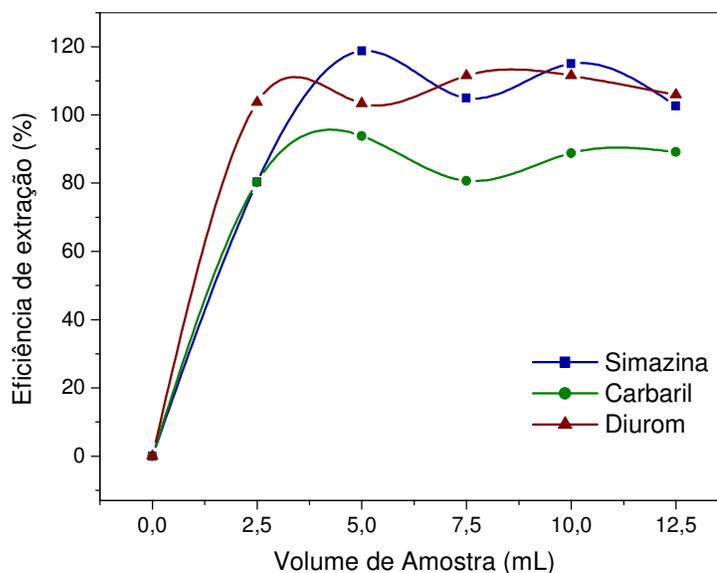


Figura 29: Determinação do volume de amostra a ser utilizado nas extrações de agrotóxicos em vinho.

A Figura 29 mostra que é possível a utilização de até 12,5 mL de amostra sem que a eficiência de extração seja significativamente prejudicada. Por uma questão de economia de tempo experimental, o volume de amostra 5 mL foi escolhido para a realização dos ensaios de extração.

4.2.2. Eficiência de Extração

Para verificar qual a quantidade de polímero imobilizada sobre o suporte de sílica que proporcionaria melhores eficiências de extração, três diferentes cargas foram

avaliadas: 10, 20 e 30 % m/m de PBD/SiO₂. A porcentagem de carbono presente nos sorventes preparados encontra-se na Tabela XII:

Tabela XII: Porcentagens de carbono em relação à massa dos diferentes sorventes.

	PBD 10 %	PBD 20 %	PBD 30 %	C18 LiChrolut
% C	7,9	14,3	21,4	18,1

O desempenho dos cartuchos foi comparado com o do sorvente mais utilizado para extração de agrotóxicos em amostras de vinho, que é o baseado em octadecil sílica (C18). Para isso, foi empregado o cartucho LiChrolut RP-18 (500 mg), da Merck.

Como mostra a Figura 30 e a Tabela XIII, os cartuchos de PBD, independentemente da carga de PBD utilizada, apresentaram desempenho similar ou superior ao cartucho comercial, alcançando altas recuperações (95-119 %) e precisão adequada (CV < 18 %), considerando a complexidade da amostra. Os valores aceitáveis indicados na literatura para eficiência de extração são de 70 – 120 % com CV inferior a 20 %⁷⁵.

⁷⁵ GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.

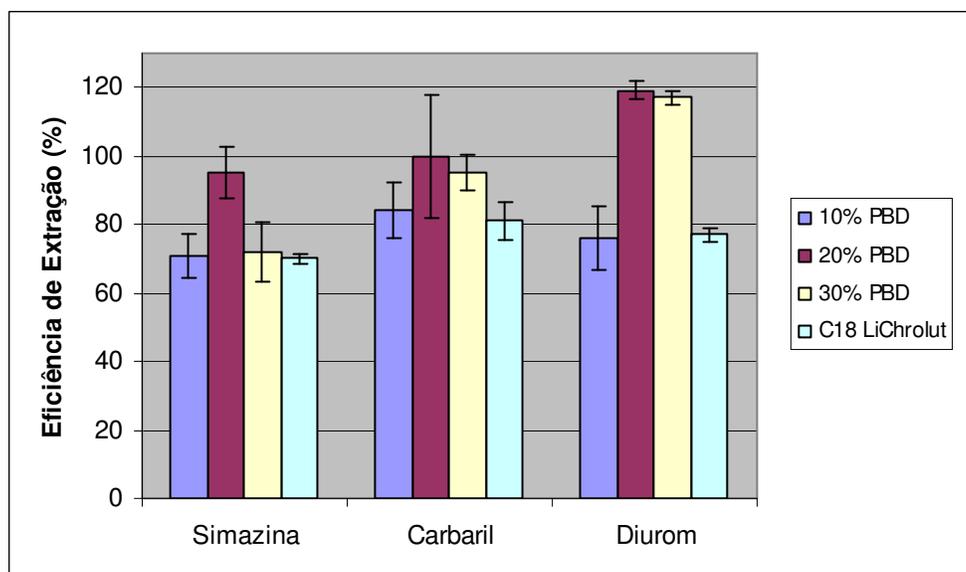


Figura 30: Comparação do desempenho dos sorventes preparados com 10 %, 20 %, 30 % m/m de PBD/SiO₂ e sorvente comercial tipo C18 LiChrolut RP-18 na extração de agrotóxicos de uma amostra de vinho.

Tabela XIII: Eficiências de extração (EE) dos diferentes agrotóxicos obtidas com os cartuchos estudados.

Agrotóxico	PBD 10 %		PBD 20 %		PBD 30 %		LiChrolut RP-18	
	EE* (%)	CV (%)**	EE (%)	CV (%)	EE (%)	CV (%)	EE (%)	CV (%)
Simazina	71 ± 6	9	95 ± 8	8	72 ± 8	12	70 ± 1	2
Carbaril	84 ± 8	10	100 ± 18	18	95 ± 5	6	81 ± 6	7
Diurom	76 ± 9	12	119 ± 3	2	117 ± 2	2	77 ± 2	2

* Eficiência de extração ± estimativa do desvio padrão absoluto (n=3)

** Coeficiente de variação (n=3)

Apesar das maiores eficiências de extração obtidas com os cartuchos de polibutadieno e sílica em comparação com cartucho comercial C18, observa-se que a repetitividade dos cartuchos comerciais é superior à dos cartuchos desenvolvidos no laboratório.

5. CONCLUSÕES

A utilização de PDC na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR se mostrou promissora, conferindo uma estabilidade química superior frente a uma fase móvel alcalina em comparação com FE preparada na ausência deste agente de entrecruzamento.

Os resultados das avaliações mostraram que a fase estacionária que rendeu melhor desempenho cromatográfico foi a preparada com 10 % de PBD na presença de 2,5% de PDC. Cargas menores se mostraram insuficientes para o recobrimento dos grupos silanóis residuais, enquanto que cargas mais elevadas prejudicaram a transferência de massa dentro da coluna, reduzindo a eficiência destas fases. O tratamento térmico que proporcionou as melhores colunas cromatográficas foi de 1 h a 120 °C seguido de 4 h a 160 °C, sob atmosfera oxidante. O processo de imobilização sob tratamento térmico e uso de peróxido é importante, uma vez que a fase preparada com o polímero simplesmente sorvido na superfície da sílica não foi capaz de reter os compostos da mistura teste. O estudo de reprodutibilidade revelou que o PBD se altera no frasco de estocagem independente dos cuidados tomados para evitar o contato com o ar durante seu manuseio. Esta alteração resultou em redução da eficiência das colunas e uma maior atividade silanofílica ao longo do tempo. Entretanto, um período de entrecruzamento do polímero no frasco de estocagem antes do preparo da FE foi necessário para a obtenção de bom desempenho cromatográfico, já que um frasco de polímero novo sem pré-entrecruzamento não rendeu boas colunas cromatográficas.

Sob as mesmas condições de preparo e com PBD no mesmo estágio de envelhecimento foi possível resolver o pico de N,N-dimetilanilina quando a sílica

Kromasil foi utilizada no lugar na sílica Rainin, evidenciando a forte influência do suporte cromatográfico na qualidade da FE.

Quanto à aplicação em SPE, pode-se concluir que o sorvente baseado em polibutadieno é um material promissor para se utilizar em SPE. Seu desempenho é comparável ao C18 disponível comercialmente, apresentando altas recuperações (95-119 %) e precisão adequada ($CV < 18 \%$), considerando a complexidade da amostra. Os valores aceitáveis indicados na literatura para eficiência de extração são de 70 – 120 % com CV inferior a 20 %.

De um modo geral, as FE de PBD apresentaram algumas características como a alta assimetria dos picos (>2), independente do tipo de tratamento ou porcentagem de carga; eficiência inferior às obtidas com polímeros convencionais, como os polissiloxanos; e, principalmente, a dificuldade de reprodução das FE em virtude do entrecruzamento espontâneo do PBD que ocorre durante a estocagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gilpin R.K., Gilpin C.S.; Pharmaceuticals and related drugs, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4275.
2. Franeta J.T., Agbaba D., Eric S., Pavkov S., Aleksic M., Vladimirov S.; HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, *Farmaco* 57 (2002) 709.
3. Dantus M., High-performance liquid chromatography in the pharmaceutical industry: Application, validation, and regulatory issues under the PAT framework, *Adv. Chrom.* 44 (2006) 237.
4. Ribela M.T.C.P., Gout P.W., Oliveira J.E., Bartolini P.; HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications *Curr. Pharmaceut. Anal.* 2 (2006) 103.
5. Perales S., Alegria A., Barbera R., Farre R.; Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid *Food Sci. Technol. Int.* (2005) 451.
6. Breithaupt D.E.; Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction, *Food Chem.* 86 (2004) 449.
7. Kamel A., Prakash C.; High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology, *Curr. Drug Metab.* 7 (2006) 837.
8. Kees F., Mair G., Dittmar M., Bucher M.; Cicloral versus neoral: A bioequivalence study in healthy volunteers on the influence of a fat-rich meal on the bioavailability of Cicloral, *Transplant. Proceed.* 36 (2004) 3234.
9. Pérez, L.M.R., Borges, J.H., Delgado M.A.R.; Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 28 (2006) 2557.
10. Nawrocki J.; The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29.
11. Zhuravlev L.T.; The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, *Colloids and Surfaces A*, 173 (2000) 1.
12. Cox G. B.; The influence of silica structure on reversed-phase retention, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 353.

13. Hassanali A.A., Singer S.J.; Model for water-amorphous silica interface: An undissociated surface, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 11181.
14. von Hohenesche C.D., Ehwald V., Unger K.K.; Development of standard operation procedures for the manufacture of n-octadecyl bonded silicas as packing material in certified reference columns for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 177.
15. Hanson M.; Polymer-coated reverse-phase packings in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 369.
16. Tonhi E., Collins K.E., Jardim I. C. S. F., Collins C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quím. Nova* 25 (2002) 616.
17. Stella C., Rudaz S., Veuthey J.-L.. Tchaplá; Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I, *Chromatographia Supp.* 53 (2001) S-113.
18. Buszewski B., Krupczynska K., Rychlicki G., Lobinski R.; Effect of coverage density and structure of chemically bonded silica stationary phases on the separation of compounds with various properties, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 829.
19. Buchmeiser M.R.; New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 233.
20. Vigna C.R.M., Bottoli C.B.G., Collins K.E., Collins C.H.; Preparation of stationary phases for reversed-phase high- performance liquid chromatography using thermal treatments at high temperature, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 60.
21. Bottoli C.B.G., Chaudhry Z.F., Fonseca D.A., Collins K.E., Collins C.H.; Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 121.
22. Faria A.M., Collins K.E., Collins C.H.; Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 51.
23. Anazawa T.A., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Chromatographic comparison of self-immobilized and radiation-immobilized poly(methyloctylsiloxane) stationary phases on various silicas. *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 116.
24. Morais L.S.R., Jardim I.C.S.F.; Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica. *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 127.

25. Lopes N.P., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography. . *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 225.
26. Petro M., Berek D.; Polymers Immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography, *Chromatographia* 37 (1993) 549.
27. Tonhi E., Collins K.E., Collins C.H.; High performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 87.
28. Tonhi E., Collins K. E., Collins C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseadas em polissiloxanos com cadeias laterais C1, C8 e C14 imobilizados sobre partículas de sílica porosa, *Revista Analytica* 14 (2005) 58.
29. Faria, A..M., Tonhi E., Collins K. E. Collins, C.H.; Stability studies of stationary phases from poly(methyltetradecylsiloxane) sorbed and immobilized onto metalized and unmodified silicas. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1844.
30. Bottoli C.B.G., Silva C.R., Collins K.E., Collins C.H.; Adsorption/immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silanized silicas. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 407.
31. Nasal A., Haber P., Kaliszan R., Forgács E., Cserhádi T., Abraham M.H.; Polyethylene-coated silica and zirconia stationary phases in view of quantitative structure-retention relationships, *Chromatographia* 43 (1996) 484.
32. Forgács, E.; Cserhádi, T.; Use of principal component analysis for studying the separation of pesticides on polyethylene-coated silica columns, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 33.
33. Kurganov A., Davankov V., Isajeva T., Unger K., Eisenbeiss F.; Characterization of covalently bonded and adsorbed polymer coatings on silica, alumina and zirconia by means of physico-chemical and chromatographic methods, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 97.
34. Rigney M.P., Weber T.P., Carr P.W.; Preparation and evaluation of a polymer-coated zirconia reversed-phase chromatographic support, *J. Chromatogr.* 484 (1989) 273.
35. Hanson M., Unger K. K. , Schomburg G.; Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr.* 517 (1990) 269.

36. Schomburg G., Köhler J., Figge H., Deege A., Bien-Vogelsang U.; Immobilization of stationary liquids on silica particles by γ -radiation, *Chromatographia* 18 (1984) 170.
37. Arenas R.V., Foley J.P.; Solvent strength, selectivity and retention mechanism studies on polybutadiene-coated alumina columns in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 113.
38. Lopes N.P.; Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para cromatografia líquida de alta eficiência, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.
39. Moraes 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.
40. Vilar W.D., Moutinho M.T.M., Menezes S.M.C., Coutinho F.M.B.; Characterization of hydroxyl-terminated polybutadiene, *Polym. Bull.* 38 (1997) 319.
41. Collins, C. H., Braga G. L., Bonato P. S.; Fundamentos de cromatografia, Editora da Unicamp, Campinas – SP, (2006).
42. Ettre, L. S.; Nomenclature for Chromatography, *Pure & Appl. Chem.* 65 (1993) 819.
43. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services - *Pesticide Analytical Manual*, vol. 1 (1999).
44. Brown, P.R., Weston A.; HPLC and CE Principles and Practice, Academic Press, London, 1997.
45. Jandera P., Novotná K.; Characterization of high pressure liquid chromatography columns using chromatographic methods, *Anal. Letters* 39 (2006) 2095.
46. Stella C., Rudaz S., Veuthey J.-L.. Tchaplá; Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part II, *Chromatographia Supp.* 53 (2001) S-132.
47. Stella C., Seuret P., Rudaz S., Carrupt P.-A., Gauvrit J.-Y., Lanteri P., Veuthey J.-L.; An effective tool for column evaluation in the analysis of basic compounds, *Chimia* 57 (2003) 210.
48. Engelhardt H., Arangio M., Lobert T; A chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation, *LC/GC* 15 (1997) 856.
49. Wieland G., Cabrera K., Eymann W; A proposal for a universal column quality certificate for HPLC columns, *LC/GC* 15 (1997) 98.

50. Lanças, F.M.; Extração em fase sólida (SPE), Ed. Rima, São Carlos, SP, 2004.
51. Holland P., McNaughton D.E., Malcolm C.P.; Multiresidue analysis of pesticides in wines by solid-phase extraction, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 79.
52. David F., Nikolai A., Sandra P.; Analysis of C10-C20 hydrocarbons in natural gas by solid phase extraction and CGC, *J. High Resol. Chromatogr.* 12 (2005) 657.
53. Maltez H.F., Melo L.F.C., Queiroz S.C.N., Jardim I.C.S.F., Curtius A.J., Carasek E.; A comparative study of homemade C18 and commercial C18 sorbents for preconcentration of lead by minicolumn solid phase extraction, *Mikrochimica Acta* 44 (2004) 17.
54. Vigna C R.M., Morais L.S.R., Collins C.H., Jardim I.C.S.F.; Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 211.
55. Faria A.M., Maldaner L., Santana C.C., Jardim I.C.S.F., Collins C.H.; Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters, *Anal. Chim. Acta* 582 (2006) 34.
56. Silva E.S.; Preparação de Fases Estacionárias para CLAE com uma Mistura de Poli(dimetilsiloxano) e Poli(metiloctadecilsiloxano) Sorvidos e Imobilizados por Tratamento Térmico sobre Sílica, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2007.
57. Lourenço J.; Preparação de Fases Estacionárias de Dimetilmetilfenilsiloxano sobre Sílica, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.
58. Vigna C. R. M.; Estudo do Efeito do Tratamento Térmico no Processo de Imobilização de Fases Estacionárias para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.
59. Kirkland J.J., DeStefano J.J.; The art and science of forming packed analytical high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 50.
60. Collins K.E, Franchon, A.C., Jardim, I.C.S.F. Rodovanovic, E., Gonçalves, M.C.; The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance, *LC-GC* 16 (2000) 106.
61. Gregg S.J., Sing K.S.W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2ª ed., Academic Press, London, (1982).

62. Fonseca D.A., Gutiérrez H.R., Collins K.E., Collins C.H.; Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 149.
63. Verzele, M., Dewaele C.; Low-viscosity solvent packing of HPLC columns using the 'up-tube' packing procedure, *LC-GC* 4 (1986) 614.
64. 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.
65. Yang X., Daí J., Carr P.W.; Analysis and critical comparison os the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases, *J. Chromatogr. A* 996 (2003) 13.
66. Reeder D.H., Li J., Carr P.W., Flickinger M.C., McCormick A.V.; Models for polybutadiene pore wall coatings in porous zirconia, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 71.
67. Lopes N.P., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Influence of air on polybutadiene used in the preparation of stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 231.
68. Lopes N.P., Morais L.S.R., Collins K.E., Jardim I.C.S.F.; Efeito do agente de entrecruzamento na estabilidade química de fase estacionária baseada em sílica e polibutadieno para CLAE-FR, 27ª Reunião Anual da SBQ, 2004, Poços de Caldas – MG.
69. Tonhi E., Collins K.E., Collins C.H.; High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 135.
70. Faria A.M., Collins K.E., Collins C.H.; New stationary phases for high-performance liquid chromatography based on poly(methyltetradecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 114.
71. 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.
72. Wong J.W., Halverson C.A.; Multiresidue analysis of pesticides in wine using C-18 solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1999) 435.
73. Deger A.B., Gremm T.J., Frimmel F.H.; Problems and solutions in pesticide analysis using solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography ion-trap mass spectrometry detection (CG-MS), *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 28 (2000) 292.

74. Poole C.F., Gunatilleka A. D., Sethuraman R.; Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 17.
75. GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.