

**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química**



**IQ  
UNICAMP**

**Preparação e Avaliação de Fase Estacionária  
C8 a partir de Suporte de Sílica Modificada**

**César Franzol Zuin**

**Dissertação de Mestrado**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isabel C.S.F. Jardim**

**Março 1998**



58 13587

A minha família, em especial à minha filha Júlia e aos meus pais

Dedico esse trabalho

“As pessoas que fazem história - descobridores, generais, astronautas, empreendedores - geralmente não têm uma sensibilidade à altura dos seus feitos. Ou têm mas não conseguem expressá-la. São raros os casos de homens de ação com capacidade de refletir sobre a sua ação e comentá-la com estilo. Quase sempre fazem coisas justamente porque não fazem frases. Fazem coisas porque não sabem fazer frases. Já os que fazem frases não fazem mais nada. “

Veríssimo, L.F., As Maravilhas, O Estado de São Paulo, 31 de Março de 1996, pg D8

**O MELHOR DE CALVIN**/Bill Watterson



## Agradecimentos

- À Profª. Drª. Isabel C.S.F. Jardim pela orientação e por acreditar na conclusão desse trabalho.
- À Profª. Drª. Carol H. Collins pelas sugestões e esclarecimentos de dúvidas.
- Ao Prof. Dr. Yoshitaka Gushiken pelo auxílio na síntese da sílica zirconizada e esclarecimento de dúvidas.
- Ao Prof. Dr. Volker Ender e Prof. Dr. Klaus Seibt pela amizade e orientação durante o meu estágio na Alemanha.
- À Drª Tania A. Anazawa pela amizade, sugestões e esclarecimento de dúvidas.
- Aos Drs. Carlos R.M. Peixoto e Flávio M. Vichi pelas sugestões e correções.
- À Profª. Drª. Sandra C. Castro (IFGW-UNICAMP) pela análise de ESCA.
- Ao Joãozinho e ao Waltinho pelos serviços técnicos prestados.
- Aos técnicos do IQ - UNICAMP pelas análises realizadas.
- Aos colegas do Laboratório de Cromatografia e Radioquímica e do Laboratório Phoenix.
- Ao CNPq e ao DAAD pelas bolsas de estudos concedidas.
- Ao Instituto de Química - Unicamp pela oportunidade concedida.
- À todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

## Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VI</b>
ÍNDICE DE TABELAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
<b>RESUMO</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>I) INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
I.A) CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASE REVERSA .....	1
I.a.1) Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas .....	2
I.a.2) Fases Estacionárias Sorvidas.....	4
I.B) SUPORTES CROMATOGRÁFICOS .....	4
I.C) SÍLICA ZIRCONIZADA COMO SUPORTE EM CLAE .....	6
I.D) ENCHIMENTO DE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS .....	13
I.d.1) Enchimento por Suspensão com Alta Pressão ("Slurry Packing").....	14
I.d.2) Enchimento a Seco ("Dry Packing").....	15
I.E) AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS COLUNAS .....	15
<b>II) OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>III) PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
III.A) MATERIAIS E REAGENTES.....	24
III.B) CONFECÇÃO DO CORPO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS .....	24
III.C) PREPARAÇÃO DA SÍLICA ZIRCONIZADA .....	25
III.c.1) Avaliação da Zirconização do Suporte.....	27
III.D) PREPARAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA SORVIDA .....	27
III.d.1) Quantidade de PMOS sobre o Suporte.....	28
III.E) RECHEIO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	29
III.F) TÉCNICAS EMPREGADAS PARA AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS.....	30
III.f.1) Testes Físicos .....	30
III.f.1.1) Medidas de Área Superficial Específica ( $S_{BET}$ ) .....	30
III.f.1.2) Medidas de Volume Específico dos Poros ( $V_p$ ) e Diâmetro Médio dos Poros .....	30
III.f.1.3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	31
III.f.1.4) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	32
III.f.1.5) Análise Termogravimétrica (ATG).....	32
III.f.1.6) Fluorescência de Raios-X .....	33
III.f.1.7) Espectroscopia Fotoeletrônica de Excitação por Raios-X (XPS).....	33
III.f.1.8) Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	35
III.f.1.8.a) Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFTS).....	36
III.f.2) Teste Químico.....	37
III.f.2.1) Análise Elementar .....	37
III.f.3) Avaliação Cromatográfica das Colunas.....	37
III.f.3.1) Sistema Cromatográfico .....	37
III.f.3.2) Misturas Testes e Parâmetros Utilizados na Avaliação das Colunas.....	39
III.f.3.3) Preparação e Escolha da Composição da Fase Móvel .....	39
III.f.3.4) Condicionamento das Colunas Cromatográficas .....	40
III.f.3.5) Testes de Estabilidade Química .....	41
<b>IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
IV.A) TESTES FÍSICOS.....	42

IV.a.1) Medidas de Área Superficial Específica ( $S_{\text{BET}}$ ), Volume Específico de Poro e Diâmetro Médio dos Poros .....	42
IV.a.2) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	43
IV.a.3) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	44
IV.a.4) Análise Termogravimétrica (ATG) .....	46
IV.a.5) Avaliação da Zirconização do Suporte .....	48
IV.a.6) Fluorescência de Raios-X .....	48
IV.a.7) Espectroscopia Fotoeletrônica de Excitação por Raios-X (XPS) .....	49
IV.a.8) Espectroscopia no Infravermelho (IV) .....	49
IV.a.8.1) Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa .....	51
IV.B) TESTE QUÍMICO: .....	54
IV.b.1) Análise Elementar .....	54
IV.C) AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS COLUNAS .....	59
IV.c.1) A Busca da Coluna Perfeita .....	59
IV.c.2) Testes de Estabilidade Química .....	65
IV.c.2.1) Lavagem com a Fase Móvel Levemente Ácida .....	65
IV.c.2.2) Lavagem com Fase Móvel Alcalina .....	67
<b>V) CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>VI) BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>72</b>

## Índice de Tabelas

TABELA 1- MEDIDA DE ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA , VOLUME DE POROS E DIÂMETRO MÉDIO DOS POROS DOS SUPORTES USADOS E DAS FE PREPARADAS.....	43
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE [Cr]VI QUANDO EM CONTATO COM OS SUPORTES UTILIZADOS .....	48
TABELA 3 - ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS OBSERVADAS NO ESPECTRO FTIR E DRIFTS DOS SUPORTES E SUPORTES + PMOS. ....	53
TABELA 4 - PORCENTAGENS DE CARBONO OBTIDAS POR ANÁLISE ELEMENTAR. ....	54
TABELA 5 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS NA ANÁLISE DA MISTURA 1 COM DIFERENTES FASES ESTACIONÁRIAS. ....	60
TABELA 6 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS CALCULADOS NA ANÁLISE DA AMOSTRA 2.....	63

## Índice de Figuras

FIGURA 1- ESTRUTURA DO POLI(METILOCTILSILOXANO) (PMOS).....	2
FIGURA 2- LIGAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA LÍQUIDA SOBRE A SUPERFÍCIE DA SÍLICA. ....	3
FIGURA 3 - LIGAÇÕES SILOXANO .....	5
FIGURA 4 - TIPOS DE SILANÓIS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DA SÍLICA GEL; 1 - GEMINAL, 2 - ISOLADO,3 - VICINAL ...	6
FIGURA 5 - EXEMPLO DE UM CROMATOGRAMA HIPOTÉTICO E ALGUMAS MEDIDAS QUE PODEM SER OBTIDAS. ....	16
FIGURA 6 - MEDIDAS E CÁLCULO DO FATOR DE ASSIMETRIA DO PICO.....	19
FIGURA 7 - DIFERENTES CAMINHOS PERCORRIDOS PELOS SOLUTOS NO INTERIOR DA COLUNA .....	19

FIGURA 8 - CURVA DE VAN DEEMTER MOSTRANDO AS CONTRIBUIÇÕES DOS TERMOS A, B E C .....	22
FIGURA 9 - COLUNA CROMATOGRÁFICA E CONEXÕES UTILIZADAS (A = PORCA TERMINAL, B = REDUTOR, C = TUBO DE ALINHAMENTO, D = FILTRO, E = ANEL DE PEEK, E, F = CORPO DA COLUNA) .....	25
FIGURA 10 - ESQUEMA DA APARELHAGEM USADA NA PREPARAÇÃO DA SÍLICA ZIRCONIZADA .....	26
FIGURA 11 - BOMBA HASKEL E SISTEMA DE ENCHIMENTO DE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS. ....	29
FIGURA 12 - PRINCÍPIO DE FOTOEMIÇÃO .....	35
FIGURA 13 - ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO UM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO.....	38
FIGURA 14 - MEV (1500x). A - SÍLICA NUA ; B - SÍLICA + PMOS .....	44
FIGURA 15 - MEV(1500x). A - SÍLICA ZIRCONIZADA; B - SÍLICA ZIRCONIZADA + PMOS .....	44
FIGURA 16 - MET DE SÍLICA + PMOS.....	45
FIGURA 17 - MET DE SÍLICA ZIRCONIZADA.....	45
FIGURA 18 - ATG DOS SUPORTES CROMATOGRÁFICOS .....	47
FIGURA 19 - ATG DAS FE PREPARADAS .....	47
FIGURA 20 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SÍLICA NUA.....	50
FIGURA 21 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE SÍLICA ZIRCONIZADA.....	50
FIGURA 22 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE SÍLICA + 50% (M/M) DE PMOS SORVIDO .....	51
FIGURA 23 - ESPECTROS DE DRIFTS DOS SUPORTES CROMATOGRÁFICOS. ....	52
FIGURA 24 - ESPECTROS DE DRIFTS DE SÍLICA E DE SÍLICA + 50% (M/M) PMOS. ....	52
FIGURA 25 - ESPECTROS DE DRIFTS DE SÍLICA ZIRCONIZADA E DE SÍLICA ZIRCONIZADA + 50% (M/M) DE PMOS.....	53
FIGURA 26 - UMA PARTÍCULA HIPOTÉTICA REVESTIDA COM PMOS.....	55
FIGURA 27 - PMOS SORVIDO SOBRE O SUPORTE. ....	57
FIGURA 28 - PMOS NO INTERIOR DOS POROS DO SUPORTE .....	58
FIGURA 29- CURVA DE VAN DEEMTER PARA A COLUNA CONTENDO SÍLICA ZIRCONIZADA + 50% (M/M) PMOS ..	60
FIGURA 30 - CROMATOGRAMA DA MISTURA 1: OBTIDO COM A COLUNA CONTENDO SÍLICA NUA + 50 % (M/M) PMOS. ....	62
FIGURA 31 - CROMATOGRAMA DA MISTURA 1: OBTIDO COM A COLUNA CONTENDO SÍLICA ZIRCONIZADA + 50% (M/M) PMOS.....	62
FIGURA 32 - CROMATOGRAMA DA MISTURA 2: OBTIDO COM A COLUNA CONTENDO SÍLICA NUA + 50 % (M/M) PMOS.....	64
FIGURA 33 - CROMATOGRAMA DA MISTURA 2: OBTIDO COM A COLUNA CONTENDO SÍLICA ZIRCONIZADA + 50 % (M) PMOS. ....	64
FIGURA 34 - LAVAGEM DAS COLUNAS COM FM MEOH/H <sub>2</sub> O 70/30 (V/V). COLUNAS ANALISADAS COM A AMOSTRA 1. ....	66
FIGURA 35 - LAVAGEM DAS COLUNAS COM FM MEOH/H <sub>2</sub> O 70/30 (V/V). COLUNAS ANALISADAS COM A AMOSTRA 2. ....	67

## Resumo

Título: Preparação e Avaliação de Fase Estacionária C8 a partir de Suporte de Sílica Modificada.

Autor: César Franzol Zuin

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel C.S.F. Jardim

Este trabalho visa o desenvolvimento de um novo tipo de fase estacionária (FE) sorvida para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), preparada a partir da fase estacionária líquida poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) sobre suporte de sílica de 7  $\mu\text{m}$ , irregular, não modificado e modificado com zircônia. A sílica zirconizada foi produzida a partir da reação de sílica com  $\text{ZrCl}_4$ . As FE sorvidas consistem no PMOS sorvido nos poros da sílica, sem ligação covalente.

As FE produzidas a partir de sílica e sílica zirconizada foram caracterizadas e avaliadas por testes químicos (análise elementar), físicos (espectroscopia no infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier, área superficial específica, volume específico dos poros, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura) e cromatográficos (avaliação através da injeção de duas misturas orgânicas sintéticas em colunas recheadas com as diferentes FE e estabilidade química frente a FM diferentes).

Os testes mostraram que o PMOS adicionado na preparação das fases estacionárias é em grande parte removido em etapas preliminares à avaliação, porém o PMOS restante fica fortemente sorvido no suporte.

A eficiência obtida a partir de suporte de sílica zirconizada é satisfatória (38000 pratos  $\text{m}^{-1}$ ) para suportes irregulares com tamanho de partícula de

7  $\mu\text{m}$ , e maior que a eficiência obtida com suporte de sílica nua (23000 pratos  $\text{m}^{-1}$ ).

Os testes de estabilidade com a fase móvel utilizada (levemente ácida) mostraram que ambos os suportes sofrem degradação quando se passa grandes volumes através da coluna, entretanto observa-se menor assimetria nos picos dos compostos analisados quando se usam colunas preparadas com suporte de sílica zirconizada. A lavagem da coluna com solventes alcalinos em condições extremamente agressivas praticamente destruiu tanto a coluna preparada com sílica nua como a de sílica zirconizada.

## Abstract

Title: Preparation and Evaluation of a C8 Stationary Phase using Modified Silica as the Chromatographic Support.

Author: César Franzol Zuin.

Supervisor: Dr. Isabel C.S.F. Jardim.

The objective of this project is the development of a new type of sorbed stationary phase (SP) for High Performance Liquid Chromatography (HPLC), prepared using the liquid stationary phase poli(methyloctylsiloxane) (PMOS) and a 7  $\mu\text{m}$  irregular silica support, either modified with zirconia or not modified. The zirconized silica was produced by the reaction of silica with  $\text{ZrCl}_4$ . The sorbed SP consists of PMOS sorbed into the pores of the silica, without covalent bonding.

The SP produced using silica and zirconized silica were characterized and evaluated by physical tests (diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy - DRIFTS, specific surface area, specific pore volume, thermogravimetric analysis, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy), chemical tests (elemental analysis) and chromatographic tests (characterization of columns packed with the different SP through injection of various synthetic mixtures and evaluation of their stability by washing with different mobile phase).

The tests showed that most of PMOS added during SP preparation is removed before chromatographic evaluation, but the remaining PMOS is strongly sorbed onto the support. The SP prepared using zirconized silica as support showed better chromatographic results than the SP prepared using non modified silica.

The efficiency obtained starting from zirconized silica is satisfactory (38000 plates  $m^{-1}$ ) for irregular supports with 7  $\mu m$  particle, and higher than the efficiency obtained with pure silica support (23000 plates  $m^{-1}$ ).

Stability tests with a slightly acid mobile phase showed that both supports suffer degradation when large volumes are passed through the column, however a lower asymmetry is observed in the peaks of the test samples when columns prepared with zirconized silica are used. The tests with alkaline solvents under extremely aggressive conditions practically destroyed both columns.

## 1) Introdução

### 1.a) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa

Em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), diz-se fase estacionária líquida (FEL) quando se tem um líquido depositado sobre um suporte sólido. A separação ocorre devido às diferentes solubilidades dos componentes da amostra no líquido da fase estacionária (FE) e no solvente (ou mistura) que constitui a fase móvel (FM), que resultam em migrações diferenciais dos solutos através da coluna cromatográfica. Este mecanismo de separação é denominado de partição<sup>[1]</sup>.

As fases estacionárias mais comumente utilizadas em CLAE são as fases reversas (FR), onde a FE é mais apolar e a FM é mais polar. Estas fases consistem de um suporte cromatográfico e de uma fase estacionária líquida, que pode estar sorvida ou imobilizada ou quimicamente ligada ao suporte<sup>[2]</sup>.

As fases estacionárias normalmente utilizadas em CLAE são preparadas principalmente usando-se sílica-gel como suporte, mas também podem ser usados alumina, vidro, sílica recoberta com zircônia, titânia, tória ou magnésia, carbono vitrificado, polímeros orgânicos e dextranas com diferentes tamanhos de partículas. O suporte é recoberto com a FEL de modo a formar um filme uniforme. Quando se prepara uma fase estacionária reversa, utiliza-se como FEL um líquido apolar do tipo poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) ou poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS)(Figura 1). Cerca de 80% das separações feitas por CLAE utilizam recheios de fase reversa<sup>[1]</sup>.

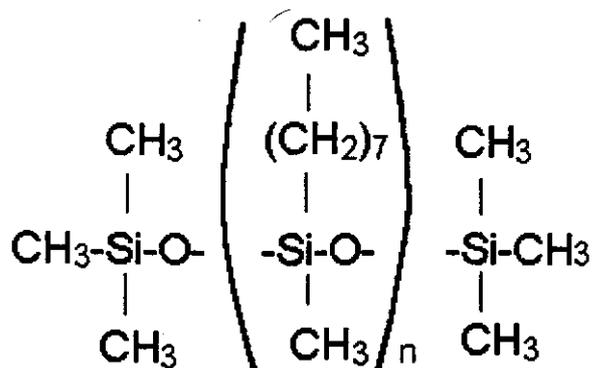


Figura 1- Estrutura do Poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), o PMOS tem 17 grupos (-CH<sub>2</sub>-) ao invés de 7.

As colunas cromatográficas recheadas com fase reversa comportam-se muito bem quando se utilizam fases móveis não agressivas, como misturas de metanol e água, e quando são operadas no seguinte intervalo  $2 \leq \text{pH} \leq 8$ . Entretanto, a sílica é instável tanto frente às fases móveis muito ácidas como muito básicas, que reagem lentamente com suas superfícies, até dissolvê-las, causando perda da fase cromatográfica e, em casos extremos, colapso da estrutura da coluna [3].

### 1.a.1) Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas

Pode-se preparar a FE ligando-se covalentemente camadas finas da fase estacionária líquida à superfície da sílica de forma homogênea e estável (Figura 2). A fase estacionária líquida reage com os grupos silanóis da sílica, sendo que grupos reativos apropriados podem ser introduzidos sobre a sílica ou sobre as cadeias da fase estacionária líquida [2].

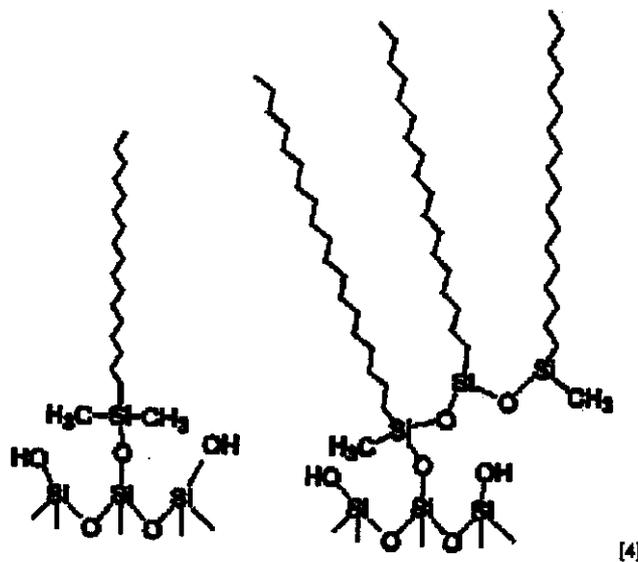
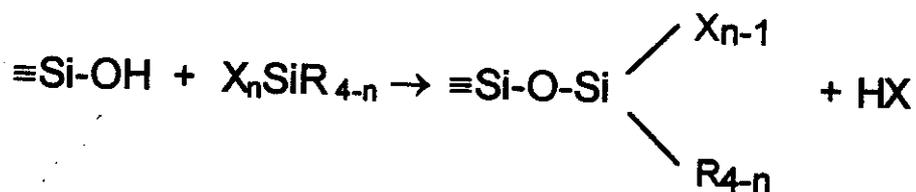


Figura 2- Ligação da Fase Estacionária Líquida sobre a Superfície da Sílica. Na figura está representado o polímero PMODS

As fases estacionárias quimicamente ligadas mais usadas e disponíveis comercialmente são as fases do tipo siloxano. Elas são preparadas pela reação dos grupos silanóis do suporte com um organossilano halogenado ou um organoalcóxido, que pode ser mono ( $XSiR_3$ ), di ( $X_2SiR_2$ ) ou trifuncional ( $X_3SiR$ ) [2], de acordo com a equação de reação química abaixo:



onde X = halogênio ou grupo alcóxido

### **I.a.2) Fases Estacionárias Sorvidas**

Na tentativa de se obterem fases com uma maior blindagem dos grupos silanóis e superfícies mais homogêneas, foi desenvolvido um novo tipo de fase estacionária para CLAE-FR, que consiste de um líquido que se encontra sorvido sobre um suporte devido a forças do tipo van der Waals. Dessa forma, a FEL pode recobrir todo o suporte e os solutos ficam mais protegidos de interações indesejáveis com a superfície da sílica<sup>[2]</sup>.

Tais FE podem ser preparadas por vários caminhos. Por exemplo, os poros da sílica gel podem ser preenchidos por múltiplas adsorções da fase estacionária líquida, no nosso caso um polímero, ou, a partir de uma solução do polímero em um solvente volátil seguido de evaporação do solvente<sup>[5]</sup>. Alternativamente, polímeros líquidos podem ser incorporados diretamente nos poros, e macromoléculas podem ser formadas dentro dos poros por uma reação controlada como polimerização ou policondensação. Obviamente, em todos os casos, o polímero incorporado deve ser insolúvel na FM <sup>[2]</sup>.

### **I.b) Suportes Cromatográficos**

O ponto vulnerável de qualquer material à base de sílica são as ligações siloxano de sua superfície (Figura 3) que são facilmente hidrolisáveis, tanto em soluções ácidas quanto básicas, enquanto as unidades ligadas, que são compostas por ligações do tipo  $R_3C-CR_3$ ,  $R_3C-H$ ,  $R_3C-O-$  e  $R_3C-NR_2$ , são estáveis em uma faixa bem maior de pH que a sílica nua<sup>[6]</sup>.

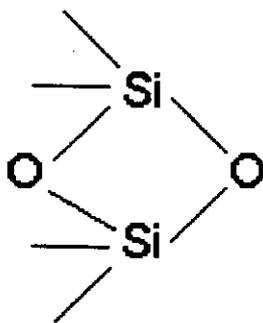


Figura 3 - Ligações Siloxano

Além da instabilidade da sílica, tem-se o aspecto da sua homogeneidade, ou seja, após o recobrimento da sílica com o polímero sempre restam grupos ativos polares que são denominados grupos silanóis residuais (Figura 4). A presença dos grupos silanóis [7,8] afeta o mecanismo de separação de maneira indesejável [9,10]. Esses grupos polares podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas bio-orgânicas ou solutos básicos e adsorvê-los. Muitas vezes a adsorção pode ser irreversível, restringindo o transporte de massa, bloqueando sítios de interação normal e criando sítios não específicos, o que diminui o desempenho da coluna, podendo deteriorá-la irreversivelmente. Quando a adsorção é reversível, tem-se o problema de picos largos, assimétricos e com cauda, que são difíceis de serem tratados quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferir nos picos de solutos que eluem em tempos similares. Existem várias possibilidades para diminuir ou eliminar as limitações da interface sílica/camada orgânica, ou interface sílica/fase móvel. Entre elas pode-se citar o capeamento, encapsulamento, formação de ligações entrecruzadas e a zirconização da superfície do suporte.

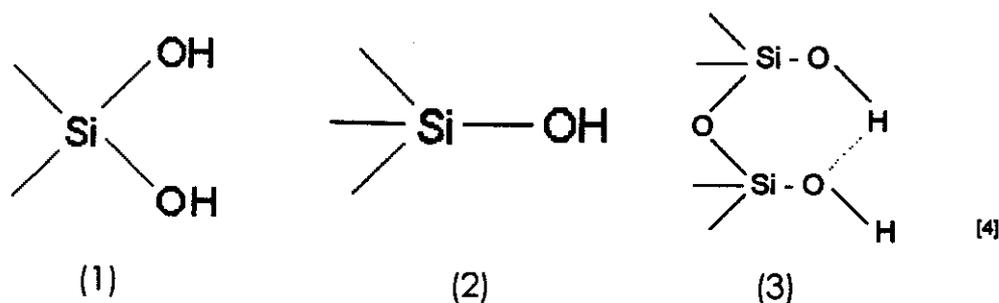


Figura 4-Tipos de Silanóis Presentes na Superfície da Sílica Gel; 1 - geminal, 2 - isolado, 3 - vicinal

A deposição de um polímero sobre suporte modificado através de reação química do suporte com átomos de metal de transição como o zircônio [11,12,13] é uma das estratégias existentes para se obterem superfícies da sílica que, quando recobertas com a FEL, apresentam maior resistência ao ataque das fases móveis ácidas ou básicas, bem como de solutos polares.

### I.c) Sílica Zirconizada como Suporte em CLAE

Há alguns anos vem crescendo o interesse na utilização de alguns elementos de transição como recheio alternativo para colunas cromatográficas utilizadas em CLAE. Dentre os vários elementos de transição, os trabalhos publicados existentes na literatura abordam apenas três metais: o zircônio, o titânio e o tório, todos na forma de seus respectivos óxidos[14].

O óxido de zircônio (IV) hidratado, zircônia, é um material que apresenta caráter anfótero, isto é, quando em solução aquosa tende a se polarizar e adquirir carga elétrica, sendo que a natureza e a importância dessa carga dependem do pH. Devido ao seu caráter anfótero existem estudos de adsorção de cátions e de ânions pelo óxido de zircônio hidratado[15]. Tal óxido tem sido usado para adsorção e pré-concentração

de cromo (VI), devido a sua capacidade em adsorver o metal em meio ácido e liberá-lo em meio alcalino<sup>[15]</sup>.

Chicz et alii<sup>[16]</sup> trataram a sílica com zircônia e compararam com magnésia, alumina e titânia. Estes suportes foram cobertos pela adsorção de polietilenoimina (PEI-6). A densidade da fase estacionária/ligante, a capacidade de carregamento, a estabilidade da coluna e de materiais característicos não baseados em sílica foram comparados com um suporte de "sílica padrão". A aplicação das fases estacionárias ao material inorgânico foi realizado através de duas etapas; primeiro a adsorção da PEI-6 ao suporte e em seguida o entrecruzamento com 1,4-butanodiol diglicil éter (BUDGE), com o objetivo de estabilizar a fase estacionária. É provável que as aminas primárias e secundárias do grupo amino do polímero interajam eletrostaticamente com o suporte inorgânico, já que as aminas terciárias estão impedidas estericamente a partir do contato direto da superfície. Diferenças na química de coordenação dos átomos da superfície influenciaram na quantidade da PEI-6 adsorvida por unidade de área e na extensão do entrecruzamento. Enquanto a sílica, titânia e zircônia possuem número de coordenação 4 e possuem características de adsorção similares, a alumina, com número de coordenação 3, tem 37% mais oxigênio na sua superfície que os outros materiais. Este dado teórico foi corroborado pelos dados obtidos onde os suportes com densidades ligantes de oxigênio similares, tais como a sílica, zircônia, titânia e magnésia, adsorveram quantidades equivalentes de PEI-6 por m<sup>2</sup> de superfície, enquanto que a alumina adsorveu 53% a mais do mesmo polímero. Apesar da diferença nos diâmetros das partículas destes suportes, que se esperava dificultar a comparação de seus desempenhos cromatográficos, houve similaridade entre os seus tempos de retenção. Quanto aos estudos de estabilidade química, foi confirmado que a titânia, alumina e zircônia/sílica são mais estáveis aos álcalis que a sílica nua e que as condições alcalinas não desgastam a poliamina adsorvida.

Kawaraha et alii<sup>[7]</sup>, baseados nas características dos materiais cerâmicos, como resistência ao calor, choque mecânico e alguns efeitos químicos, investigaram a capacidade cromatográfica de materiais cerâmicos de zircônia e titânia na separação de substâncias biogênicas. Para a realização destes estudos foram utilizadas partículas de sílica gel porosa (5  $\mu\text{m}$ ), zircônia não porosa de 3  $\mu\text{m}$  e titânia porosa (5-15  $\mu\text{m}$ ), sendo suas capacidades adsorptivas avaliadas através de parâmetros de capacidade e atividade. Através destes parâmetros foi verificado que a titânia e a zircônia possuem maior capacidade de adsorção que a sílica. O número de pratos por metro obtidos foi de 56000, 12000 e 1000 para a sílica, titânia e zircônia, respectivamente, devido ao tamanho das partículas utilizadas. O ideal seria que as partículas fossem menores e mais uniformes. O fator de retenção ( $k$ ) de vários compostos foi comparado sob as mesmas condições de eluição e observou-se que a ordem de eluição dos compostos ácidos e básicos foi inversa nas colunas de titânia e zircônia, quando comparadas com a de sílica, isto é, compostos ácidos eluíram depois dos compostos básicos, sugerindo que os mecanismos de adsorção destes metais diferem da sílica. Isso é uma vantagem na análise de compostos básicos que, quando eluem em colunas a base de sílica, possuem picos com caudas, devido as interações com grupos silanóis livres. Essas propriedades adsorptivas únicas de titânia e zircônia podem ser usadas na separação de compostos que são difíceis de separar com enchimentos usuais. Por isso, colunas de titânia e zircônia foram usadas na separação de substâncias biogênicas, incluindo os ribonucleosídeos e desoxiribonucleosídeos.

A superfície química da zircônia e da titânia que, quando amorfa, representa compostos mais ou menos iônicos de cátions metálicos tetravalentes, é altamente polar. Os grupos hidroxilas ligados aos íons metálicos neutralizam a carga da superfície. A zircônia e a titânia possuem dois tipos diferentes de grupos hidroxilas; uma delas é a hidroxila livre, agindo

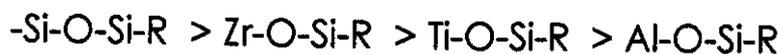
como base, enquanto a ponte de hidroxila entre dois átomos metálicos vizinhos age como ácido<sup>[18]</sup>.

Materiais de recheio de fase reversa foram obtidos modificando-se a superfície dos óxidos metálicos com C18 e sua maior contribuição foi a estabilidade ao pH. Os recheios à base de Ti/C18 foram estáveis até pH 11 e zircônia/C18 estáveis até pH 12 sem qualquer efeito no fator de retenção ou largura dos picos dos solutos analisados<sup>[18]</sup>.

Rigney et al<sup>[19]</sup> estudaram as propriedades trocadoras da zircônia não modificada. Para tanto, eles utilizaram a zircônia porosa esférica de diferentes lotes e propriedades físicas e compararam o seu desempenho cromatográfico com o da alumina. A estabilidade da zircônia e da alumina a pH 1, 3, 10, 12 e 14, sob condições estáticas pela adição de 100 mg do suporte a 900 mL de solução de hidróxido de sódio em concentração apropriada, foi avaliada monitorando-se o aspecto da zircônia ou da alumina na solução sobrenadante e determinando-se a concentração de óxido metálico por Espectroscopia por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-ES). Não foram encontradas quantidades de zircônia superiores aos limites de detecção no ICP-ES, enquanto foram encontrados níveis detectáveis de alumina para pH 1, 3, 12 e 14. Portanto, em termos de estabilidade em fases móveis aquosas a pH extremos (ácidos ou básicos), a zircônia é superior a sílica e a alumina. As áreas superficiais são baixas quando comparadas com as das sílicas utilizadas em CLAE, mas é necessário lembrar que ao se considerar os dados de área superficial, a densidade verdadeira da zircônia monoclinica é  $5,8 \text{ g mL}^{-1}$ , enquanto que a da sílica é  $2,3 \text{ g mL}^{-1}$ . Portanto devido a sua alta densidade, a área superficial da zircônia é comparável a da sílica, se considerada em termos de área superficial por unidade de volume (sílica =  $125 \text{ m}^2 \text{ mL}^{-1}$  e zircônia =  $122 \text{ m}^2 \text{ mL}^{-1}$ ). A concentração de sítios adsortivos em sua superfície foi estimada através da curva de análise termogravimétrica (ATG), encontrando-se 9,8

mol m<sup>-2</sup> de sítios ativos, assumindo-se arbitrariamente que o decréscimo de massa entre 205-455 °C é devido a perda de água adsorvida e que o decréscimo entre 455-810 °C é resultante da condensação dos hidróxidos de zirconóis vicinais. Após os resultados acima, foram encontrados os fatores de retenção para vários solutos, entre eles, benzilamina, ácido benzóico, e ácido hidroxibenzóico, para uma variedade de soluções tampão. Os resultados demonstraram que a zircônia atua com propriedades trocadoras catiônicas e aniônicas, dependendo do pH da solução e da natureza do tampão. Examinando-se a adsorção de várias espécies de fosfato nesta superfície verificou-se que os organofosfonatos são mais fortemente adsorvidos que os organofosfatos. Os oxianions, nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), bromato (BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>), tetraborato (B<sub>4</sub>O<sub>7</sub><sup>-2</sup>) e tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>) também são fortemente retidos pela zircônia.

Em outro estudo, Rigney et alii<sup>[20]</sup> deu continuidade aos trabalhos acima através da preparação do suporte cromatográfico para CLAE por fase reversa pela deposição e entrecruzamento do polibutadieno na superfície da zircônia microporosa. Inicialmente, tentou-se produzir fase reversa baseada na zircônia pela modificação da superfície com organossilanos. Embora um suporte de fase reversa com "cobertura moderada" tenha sido obtido, a zircônia silanizada não foi estável em fases móveis aquosas devido a suscetibilidade das ligações Zr-O-Si à hidrólise. Isso reflete bem a sequência de estabilidade hidrolítica dos óxidos silanizados:



A quantidade de carbono na superfície foi facilmente variada pelo ajuste da quantidade de polibutadieno (PBD) sobre o suporte. O processo de modificação foi reproduzível, pelos dados obtidos através de análise de carbono para diferentes suportes preparados a partir do mesmo lote de sílica com a mesma quantidade de polibutadieno. Quando se utilizou teor alto de

carbono, a inspeção microscópica das partículas do suporte mostraram uma superfície externa irregular com alto grau de agregação de partículas. Em contraste, para carbono em níveis de monocamadas, a perda de área superficial é comparável às encontradas na silanização da sílica com octadecilsilano. A eficiência da reação de entrecruzamento, iniciada por radicais livres, produzidos pelo peróxido de dicumila, foi demonstrada pelos espectros no infravermelho por reflectância difusa com transformada de Fourier (DRIFTS). A zircônia/PBD apresentou características de retenção similares às fases ligadas alquil-sílica para a retenção de pequenos solutos em tampão fosfato de pH 3. Sob outras condições, particularmente quando o fosfato está ausente da fase móvel, solutos ácidos foram fortemente retidos devido a interação com sítios trocadores aniônicos (básicos) na superfície. Estas interações podem ser controladas pela adição de fosfato à fase móvel. Não houve qualquer evidência de degradação do suporte mesmo quando este foi exposto à hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  à  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . A alumina/PBD não foi estável nestas condições.

Estes estudos prévios<sup>[19,20]</sup> com zircônia porosa, demonstrando a estabilidade da zircônia até pH 14 e a resistência pela deposição de polímeros até pH 14 a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (300 vezes o volume da coluna) sem perda detectável do suporte ou da cadeia polimérica, motivaram outros pesquisadores a investigações posteriores. Sabe-se que temperaturas altas e condições extremamente alcalinas ou ácidas são necessárias na esterilização de colunas para utilização na purificação de produtos farmacêuticos ou limpeza de colunas após injeções sucessivas de amostras brutas. Obviamente, um suporte cromatográfico que possa suportar muitos ciclos a temperaturas altas combinado a condições extremas de acidez é de grande aplicabilidade em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. A zircônia, além das características já citadas, possui natureza refratária, podendo ser aquecida à temperatura superior a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ , com menor mudança em sua estrutura porosa que a sílica ou alumina<sup>[14]</sup>.

Partículas de zircônia microporosas foram sintetizadas e suas superfícies modificadas para CLAE por fase reversa. Fases estacionárias monoméricas e poliméricas foram obtidas por reação com octadecildimetilclorossilano e octadeciltriclorossilano, respectivamente<sup>[11,21]</sup>. A cobertura da zircônia com octadecil foi aproximadamente a mesma que os sorventes a base de octadecil-silica. Estas fases foram avaliadas em termos de propriedades cromatográficas de fase reversa com espécies iônicas não polares e levemente polares sob uma ampla faixa de composição de fase móvel e de pH. A zircônia-octadecil monomérica com capeamento ("end-capping") exibiu algumas interações metálicas tanto com solutos ácidos como com básicos, que foram reduzidas na presença de agentes interferentes (íon tartarato) presentes na fase móvel. Os sorventes octadecil-zircônia poliméricos exibiram maior retenção que os monoméricos, uma vez que para os vários solutos investigados, suas adsorvidades residuais em relação a solutos ácidos foram muito menores. Os estudos de estabilidade, conduzidos a pH extremos, 2 a 12, mostraram que a octadecil-zircônia polimérica é mais estável que a monomérica e que a fase polibutadieno-zircônia, por sua vez, é mais estável que as C18<sup>[12]</sup>, resistindo ao pH de 1 a 14. Estas fases estacionárias foram úteis na separação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alquilbenzenos, séries homólogas de fenil álcoois, oligossacarídeos, dansil aminoácidos, peptídeos e proteínas<sup>[11,21]</sup>. Solutos básicos, tais como aminas, foram analisados em colunas recheadas com a fase estacionária polibutadieno-zircônia e eluidos com tampões neutros, ácidos ou alcalinos resultando em picos simétricos.

Wirth et alii<sup>[13]</sup>, no mesmo período, caracterizaram, em termos de área superficial e grau de recobrimento, partículas de zircônia modificadas com n-octadecil (C18), carboidratos e Cibacron Blue. A densidade dos grupos hidroxilas da superfície foi determinada por <sup>1</sup>H RMN e a área superficial foi medida através da quantidade de íons fosfatos que se ligaram aos zirconóis (ácidos de Lewis) presentes na superfície. Os resultados experimentais

demonstraram que a zircônia modificada pelo Cibacrom Blue é estável até pH 10,5, que a modificada pela fase reversa C18 é estável até pH 13 e pela fase ligada de carboidrato até pH 12.

Kurganov et alii<sup>[22]</sup> utilizaram sílica, alumina e zircônia porosa recobertas por ligação covalente de copolímeros de estireno e vinilsilanos com e sem entrecruzamento após a imobilização da camada polimérica. Através da adsorção de nitrogênio e porosimetria de mercúrio, foi analisado a estrutura dos poros que revelaram diferentes distribuições de polímero ao longo da superfície modificada e mudanças da porosidade dos óxidos iniciais dependendo do método de imobilização do polímero. A amostra de zircônia exibiu volume específico de poros extremamente baixo e uma área superficial de  $17 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para a zircônia nua. Os valores de área superficial, volume de poros e diâmetro de poros, foram reduzidos a metade após modificação de sua superfície com poliestireno. O recobrimento da superfície com o polímero, no entanto, pouco afetou a forma de distribuição do tamanho dos poros. Compostos básicos foram eluídos com picos simétricos pela alumina e zircônia modificadas por ligações covalentes do copolímero (estireno e vinilmetildietoxisilano), indicando a ausência de interações não específicas entre a superfície e o soluto.

### **I.d) Enchimento de Colunas Cromatográficas**

O objetivo dos vários métodos de enchimento de colunas em CLAE é obter colunas estáveis, altamente eficientes e reproduzíveis<sup>[2]</sup>. Há alguns anos atrás, poucas pessoas arriscavam recheiar suas próprias colunas, devido ao aspecto misterioso que envolvia o procedimento do enchimento. Atualmente, graças à grande quantidade de artigos publicados sobre o enchimento de colunas, muitas pessoas tentam fabricar as suas próprias colunas, embora aprendam que não basta seguir o procedimento dos artigos, pois inexiste um método amplo e universal capaz de produzir colunas

sempre com o mesmo nível de qualidade. Além disso, a técnica de enchimento não só depende da metodologia empregada, como também do material de enchimento e da habilidade do usuário em encher colunas. A técnica de enchimento de colunas tem que ser encarada como arte<sup>[23]</sup>.

No enchimento de colunas para cromatografia são comumente encontradas duas técnicas:

### **I.d.1) Enchimento por Suspensão com Alta Pressão ("Slurry Packing")**

Este método é normalmente empregado para recheiar colunas cujo tamanho das partículas da fase estacionária seja menor que 20  $\mu\text{m}$ .

Este método consiste em fixar um filtro de aço inoxidável poroso na extremidade da coluna, e ligar a outra extremidade a um reservatório conectado a uma bomba apropriada; o recheio é suspenso em um solvente (ou solução), denominado solvente de suspensão, e é transferido (bombeado) pelo solvente propulsor do reservatório para o interior da coluna. O material de recheio acumula-se, a partir do filtro, até formar o leito da coluna. Durante o processo de enchimento a pressão é tipicamente da ordem de 25-50 MPa. Quando a pressão retorna a zero a coluna é removida do sistema, e condicionada com a fase móvel a ser utilizada<sup>[24]</sup>.

"Experimentos individuais diferem grandemente no tempo e na qualidade da separação. Encontra-se enorme dificuldade em encher colunas homoganeamente e reprodutivamente<sup>[25]</sup> pela técnica de enchimento por suspensão com alta pressão (slurry packing) ainda que o procedimento seja padronizado"<sup>[26]</sup>.

### **I.d.2) Enchimento a Seco ("Dry Packing")**

O enchimento de colunas à seco é uma técnica usualmente confinada à preparação de colunas usando partículas maiores que 20  $\mu\text{m}$ , embora hajam trabalhos reportando o enchimento à seco de colunas para CLAE com diâmetros menores<sup>[27,28]</sup>. As partículas são colocadas diretamente na coluna, assim como as partículas usadas no enchimento de colunas recheadas para cromatografia gasosa<sup>[29,30]</sup>. O enchimento à seco foi exaustivamente tentado em nosso laboratório<sup>[28]</sup> e não mostrou resultados satisfatórios.

No enchimento a seco usando partículas menores que 20  $\mu\text{m}$ , substitue-se o solvente propulsor por um gás pressurizado. Liga-se o gás pressurizado a um "T", o recheio (seco) é colocado em um reservatório ligado em outra extremidade do "T" e é transferido para a coluna ligada na extremidade oposta ao gás pressurizado.

### **I.e) Avaliação Cromatográfica das Colunas**

As colunas devem sempre ser testadas antes de serem usadas. Para isso, são utilizados alguns parâmetros cromatográficos calculados a partir de medidas feitas nos cromatogramas (Figura 5) obtidos após a injeção de amostras conhecidas, que indicam a qualidade da coluna.

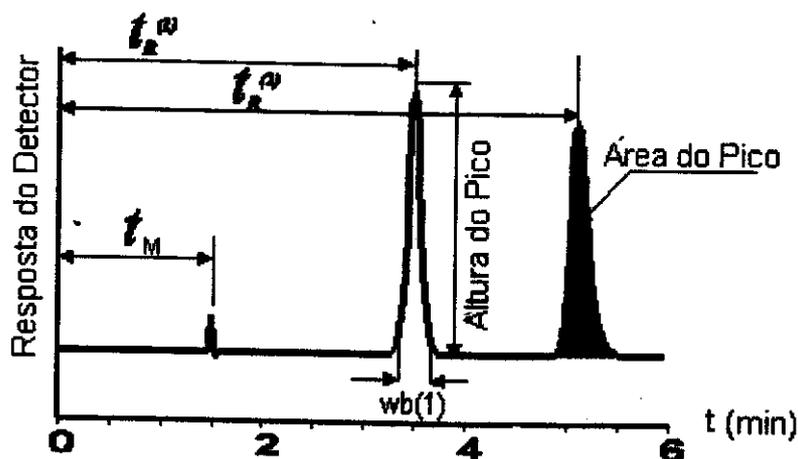


Figura 5 - Exemplo de um Cromatograma Hipotético e algumas medidas que podem ser obtidas.

Onde:

$t_{R(1)}$  e  $t_{R(2)}$  são os tempos de retenção dos solutos 1 e 2, respectivamente, ou o tempo gasto desde o momento da injeção até a saída do máximo do componente do sistema.

$t_M$  é o tempo de retenção de um soluto não retido pela fase estacionária (tempo de retardamento da FM).

$w_b(1)$  é a largura do pico na base referente ao soluto 1.

A partir do cromatograma impresso ou a partir dos dados do computador (e/ou registrador-integrador) pode-se calcular vários parâmetros cromatográficos.

O fator de retenção,  $k$ , é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na FE e percorrendo a coluna na fase móvel de acordo com a Equação 1. Os valores ideais de  $k$  devem variar entre 2 e 10. Valores maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a FE e, conseqüentemente um longo tempo de análise. Por outro lado,

valores de  $k$  menores que 2 implicam em pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise<sup>[2]</sup>.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Equação 1

Onde:

$t_R'$  = tempo de retenção ajustado.

A resolução ( $R_s$ ) refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada pela Equação 2. Valores de  $R_s$  acima de 1,5 são considerados ideais, indicando uma boa separação entre os picos<sup>[31]</sup>.

$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{wb_{(1)} + wb_{(2)}} \right) = 1.177 \left( \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{wh_{(1)} + wh_{(2)}} \right)$$

Equação 2

Onde:

$wh_{(1)}$  e  $wh_{(2)}$  são as medidas da largura à meia-altura do pico referente ao soluto 1 e 2, em unidades de tempo.

Um dos principais parâmetros cromatográficos utilizados nesse trabalho é o número de pratos ( $N$ ). Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio

do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel e é calculado pela Equação 3.

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{wh} \right)^2$$

Equação 3

Porém, como existem colunas com diferentes tamanhos, é usual expressar em pratos por metro (N/m), conforme a Equação 4.

$$N/m = \frac{N}{L}$$

Equação 4

Onde:

L é o comprimento da coluna em metros

A Equação 3 só é válida para picos simétricos, sem cauda (gaussianos), por isso, para uma maior confiabilidade no cálculo de N, calcula-se o fator de assimetria do pico,  $As_{10}$ , a 10% da altura do pico como mostra a Figura 6. Os valores de  $As_{10}$  considerados ideais na literatura<sup>[32]</sup>, devem estar entre 0,9 e 1,2, embora menos desejáveis, valores de 1,6 são aceitos<sup>[33]</sup>.

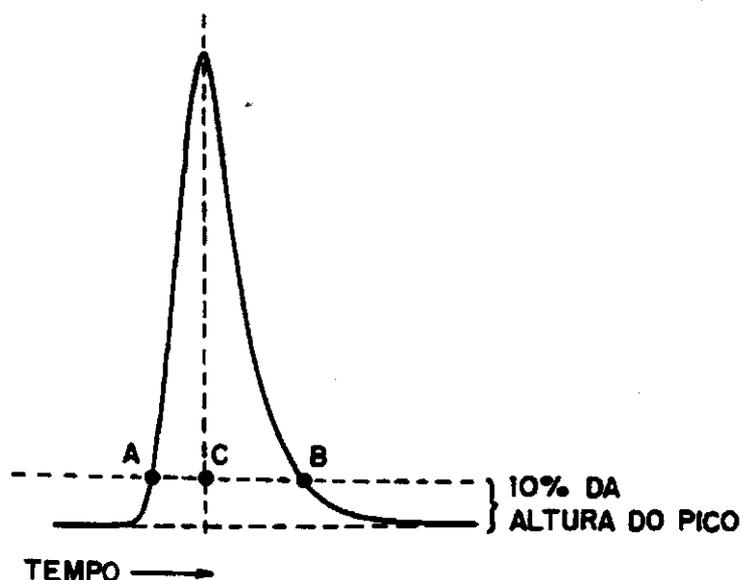


Figura 6 - Medidas e Cálculo do fator de assimetria do pico

$$AS_{10} = \frac{CB}{AC}$$

Equação 5

Vários fatores podem contribuir para o aumento da assimetria de um pico, entre eles, a presença de grupos silanóis residuais<sup>[2]</sup> e os diferentes caminhos percorridos pelos solutos e FM no interior da coluna cromatográfica (Figura 7), que podem ser causados por imperfeições no leito cromatográfico.

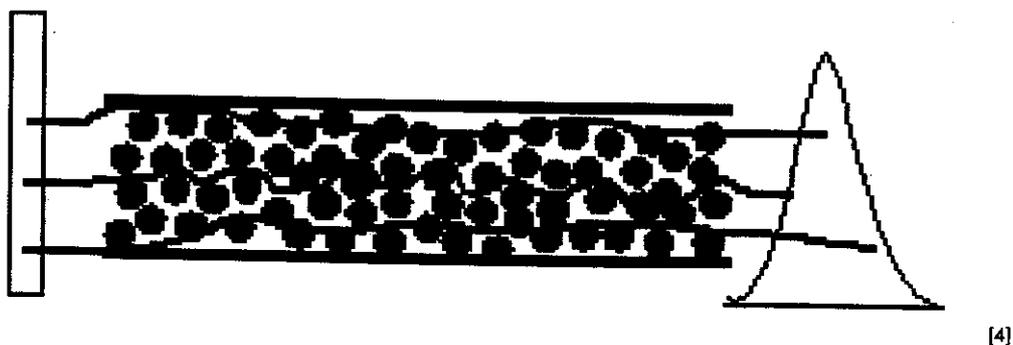


Figura 7 - Diferentes caminhos percorridos pelos solutos no interior da coluna

O fator de separação,  $\alpha$ , é uma medida da seletividade de um sistema cromatográfico, assim quanto mais seletivamente a FE reter o segundo componente analisado, maior será o fator de separação. Se  $\alpha = 1$  não existem diferenças termodinâmicas entre os dois componentes em um dado sistema e eles não podem ser separados. Entretanto, quando  $\alpha > 1$  não significa que os picos estão totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem parcialmente sobrepostos. Conseqüentemente, não somente com valores elevados de  $\alpha$  se consegue separação, é necessário também que os picos sejam estreitos. Os valores de  $\alpha$  podem ser calculados pela Equação 6.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Equação 6

O número de pratos, calculado para um determinado composto teste, está relacionado com as características da coluna. Desta forma, ele varia com o comprimento da coluna, diâmetro das partículas de enchimento, entre outros fatores e torna difícil a comparação entre colunas de dimensões diferentes. Para tornar essa comparação possível, utiliza-se a altura equivalente a um prato,  $H$ , que é dada pela equação abaixo<sup>[34]</sup>:

$$H = \frac{L}{N}$$

Equação 7

A eficiência de uma coluna, em termos de altura equivalente a um prato,  $H$ , pode ser determinada através de outros fatores, descritos pela equação de van Deemter (Equação 8):

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Equação 8

Onde:

$\mu$  = velocidade linear da fase móvel obtida pela Equação 9

$$\mu = \frac{L}{t_M}$$

Equação 9

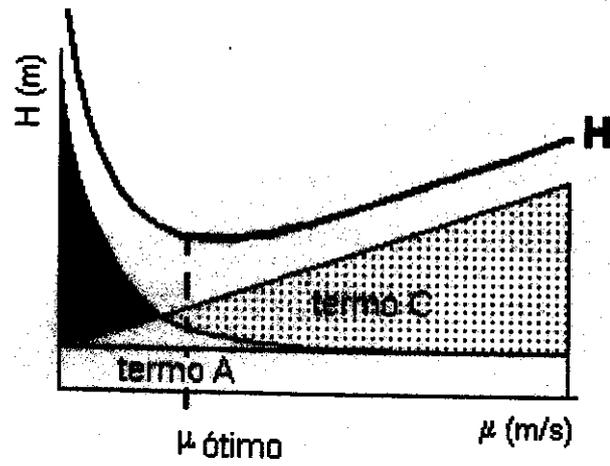
O termo  $A$ , difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto.

O termo  $B$ , difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na FM.

O termo  $C$ , transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto da fase estacionária para a fase móvel.

A curva de van Deemter (Figura 8) mostra que existe uma vazão ótima que está diretamente relacionada com a velocidade linear da fase móvel,

na qual a altura equivalente a um prato terá valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência do sistema será máxima<sup>[35]</sup>.



[4]

Figura 8 - Curva de van Deemter mostrando as contribuições dos termos A, B e C

## II) Objetivos

Este trabalho dá continuidade ao projeto de desenvolvimento de novas FE sorvidas (não-ligadas) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) desenvolvido em nosso laboratório. Nos trabalhos anteriores<sup>[2,34,36,37]</sup>, o polímero, poli(metiloctilsiloxano), encontrava-se sorvido nos poros da sílica e as colunas recheadas com esse material apresentavam bom comportamento cromatográfico e boa estabilidade.

No entanto, sabe-se que a sílica gel usada como suporte em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é instável à pH extremos<sup>[9]</sup> e sofre degradação com o tempo, devido ao arraste da FE líquida sorvida sobre o suporte. Então optou-se pela modificação do suporte através do enxerto de zircônia na sílica<sup>[15]</sup> produzindo um novo tipo de fase estacionária sorvida.

Para avaliar melhor a nova fase estacionária preparada, caracterizou-se por métodos químicos, físicos e cromatográficos a superfície da sílica zirconizada, antes e/ou depois da sorção do polímero e comparou-a com as FE preparadas a partir de suporte de sílica nua.

Dessa forma, pode-se dizer que o objetivo principal foi desenvolver uma tecnologia de preparação de FE sorvidas, a partir de suportes quimicamente modificados que resultasse em colunas tão eficientes ou melhores que as preparadas a partir de sílica nua.

## **III) Parte Experimental**

### **III.a) Materiais e Reagentes**

Como suporte cromatográfico utilizou-se a sílica gel Polygosil 100, da Machery-Nagel Düren, Germany, com tamanho de partículas de 7  $\mu\text{m}$ , volume médio dos poros de 1,94 mL g<sup>-1</sup> e diâmetro dos poros de 13,8 nm.

A fase estacionária líquida foi o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), da Petrarch Systems Silanes & Silicones. Massa Molar = 6200 g mol<sup>-1</sup>.

A água utilizada na preparação da fase móvel foi obtida em um deionizador Milli-Q® e filtrada em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . O metanol, grau cromatográfico, (obtido de diversas fontes) foi filtrado em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser usado.

Todos os demais reagentes foram obtidos de fontes comerciais, grau analítico (PA) ou superior, exceto se houver outra indicação expressa.

### **III.b) Confeção do Corpo das Colunas Cromatográficas**

O corpo das colunas cromatográficas de 125 mm de comprimento e 3,6 mm de diâmetro interno (Figura 9) e as conexões<sup>[38]</sup> usadas neste trabalho, foram confeccionadas no Instituto de Química da UNICAMP a partir de um tubo de aço inoxidável 316L, trafilado e sem costura.



Figura 9 - Coluna Cromatográfica e Conexões utilizadas (a = Porca Terminal, b = Redutor, c = tubo de alinhamento, d = filtro, e = anel de PEEK, e, f = Corpo da Coluna)

O polimento da superfície interna dos tubos foi feito através de uma técnica desenvolvida em nosso laboratório<sup>[39,40]</sup>.

### III.c) Preparação da Sílica Zirconizada

Inicialmente preparou-se um lote de sílica zirconizada para ser usado no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho. O procedimento adotado foi o de Gushiken et alii<sup>[41]</sup> modificado.

Foram pesados 5,27 g de  $ZrCl_4$  (Merck) em atmosfera inerte ( $N_2$ ), e transferidos com auxílio de 60 mL de etanol anidro (Etanol Absoluto Merck, seco anteriormente usando peneira molecular 40 nm) para um balão de três bocas, já purgado com  $N_2$  (cujo esquema pode ser visualizado na Figura 10). Na saída do condensador foi colocado um tubo secante. Adicionaram-se então 20,69 g de sílica e fechou-se o sistema, submetendo-o a um aquecimento brando, sob agitação, até que se iniciasse um refluxo lento, que foi mantido por oito horas; em seguida o refluxo foi interrompido e a solução foi deixada em repouso por 12 horas aproximadamente. Com o auxílio de uma seringa de vidro com agulha longa, foi removido todo etanol possível; o sólido foi lavado com 3 porções de 20 mL de metanol anidro e deixado em repouso por 24 horas. Filtrou-se em membrana porosa (Millipore, 0,22  $\mu m$  de diâmetro de poro) e hidrolisou-se o sólido obtido com água

deionizada. Lavou-o até remover todo o cloreto (Cl), cuja presença foi testada com solução de nitrato de prata <sup>[41]</sup>.

O sólido obtido foi transferido para um béquer e seco em estufa a 100 °C por 48 horas. A seguir a sílica zirconizada foi guardada em um frasco previamente identificado.

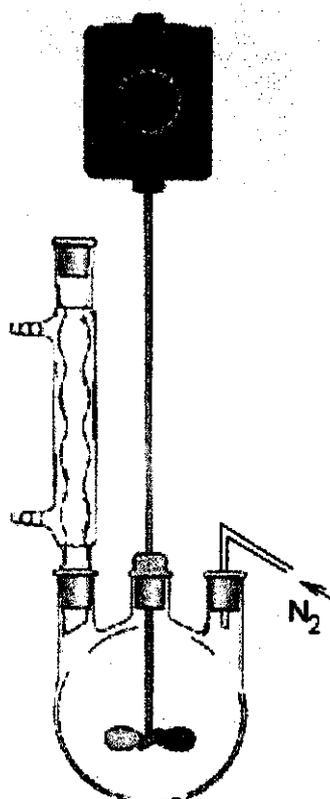
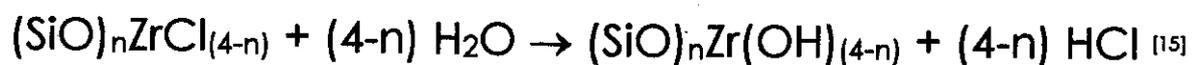
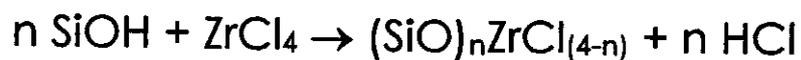


Figura 10 - Esquema da Aparelhagem usada na Preparação da Sílica Zirconizada

As equações das reações químicas que ocorrem na síntese da sílica zirconizada são:



### III.c.1) Avaliação da Zirconização do Suporte

Em um outro trabalho, Gushiken et alii<sup>[42]</sup> indicam que a principal propriedade da sílica zirconizada é ser trocadora de íons, como no caso específico do cromo (VI)<sup>[43]</sup>, e que a verificação desta propriedade comprova a zirconização da sílica gel; então fez-se uma análise semi-quantitativa para verificar a zirconização do suporte preparado nesse trabalho.

Num béquer de 50 mL, foram colocados 100 mg de sílica zirconizada e 5,0 mL de solução de  $K_2Cr_2O_7$   $1,2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e 5,0 mL de água deionizada. Cobriu-se o béquer com papel alumínio (para evitar a penetração de poeira do ar), agitou-se rapidamente a mistura e deixou-se em repouso por 48h. Usando o espectrofotômetro HP 8452 A (Diode Array Spectrophotometer, interfaciado a um computador tipo PC-AT 486) calculou-se a concentração de cromo na solução sobrenadante, fazendo-se as medidas em 440 nm (comprimento de onda analítico do cromo)<sup>[44]</sup>. Repetiu-se esse procedimento para sílica.

### III.d) Preparação da Fase Estacionária Sorvida

Para a preparação das fases estacionárias foi adotado o método da evaporação descrito por Basso<sup>[5]</sup>.

O suporte, sílica ou sílica zirconizada, foi ativado antes da adição do PMOS; esse processo consistiu em manter o suporte a 150 °C por pelo menos 8 horas para deixar livre os grupos silanóis da superfície do suporte que vai receber o PMOS. Depois de ativado, o suporte foi transferido para um dessecador e, após ser resfriado, foi usado na preparação do material de recheio.

Pesou-se a massa necessária de PMOS em um béquer de 100 mL; dissolveu-se o PMOS em 60 mL de diclorometano<sup>[45]</sup> e deixou-se esta solução sob agitação magnética enquanto se adicionava, muito lentamente, o suporte (sílica zirconizada ou sílica gel). Manteve-se a agitação lenta por mais três horas após o final da adição do suporte cromatográfico. A seguir deixou-se na capela, à temperatura ambiente, para evaporar o diclorometano adicionado. Desta forma, produziu-se a FE sorvida que foi usada no recheio das colunas cromatográficas.

### III.d.1) Quantidade de PMOS sobre o Suporte

As fases estacionárias preparadas no início do trabalho experimental possuíam quantidades variadas de polímero, a fim de verificar a influência desta variável. Estudos anteriores em nosso grupo<sup>[34,46]</sup>, mostraram que a eficiência da separação varia com a quantidade de fase estacionária líquida contida no suporte. Assim sendo, devido a similaridade da fase estacionária líquida a ser usada (Poli(metiloctilsiloxano) - PMOS), consideraram-se os melhores resultados obtidos por Anazawa e Jardim<sup>[34,36]</sup> como ponto de partida para a preparação do material de recheio a ser utilizado.

Foram preparados pequenos lotes de FE na faixa de 40-60% de PMOS em relação a quantidade de fase preparada, no entanto, após os testes iniciais optou-se pela FE contendo 50% PMOS (m/m), uma vez que esta porcentagem de carregamento foi a que mostrou melhores resultados. Sempre que necessário, foram preparados pequenos lotes de 5 g de FE sendo que foram utilizados 60 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dissolver o PMOS.

### III.e) Recheio das Colunas Cromatográficas

As colunas foram recheadas pelo método desenvolvido por Anazawa<sup>[2]</sup>, utilizando uma bomba Haskel modelo 51769 (Figura 11) a aproximadamente 34,5 MPa (5000 psi) a partir de suspensões 10% (m/v) de FE em CCl<sub>4</sub>. Como solvente propulsor foi utilizado o metanol.

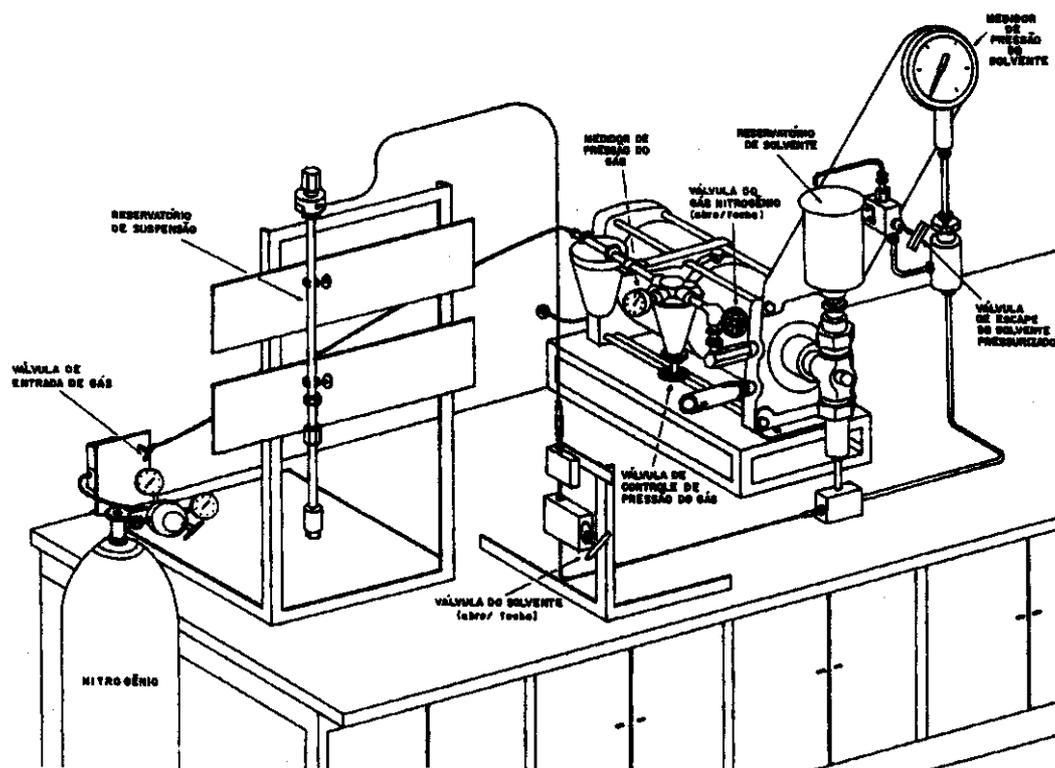


Figura 11 - Bomba Haskel e sistema de enchimento de colunas cromatográficas<sup>[2]</sup>.

### **III.f) Técnicas Empregadas para Avaliação das Fases Estacionárias**

#### **III.f.1) Testes Físicos**

##### **III.f.1.1) Medidas de Área Superficial Específica ( $S_{BET}$ )**

Para obter a extensão da superfície do material analisado, foram medidas as áreas superficiais específicas da sílica, sílica zirconizada e das FE preparadas. Para tanto, utilizou-se o método BET (Brunauer, Emmett e Teller), que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diversas pressões na temperatura do nitrogênio líquido <sup>[3,47,48]</sup>.

O aparelho usado na determinação de  $S_{BET}$  foi o medidor de área superficial Micromeritics, Flow Sorb II, modelo 2300.

##### **III.f.1.2) Medidas de Volume Específico dos Poros ( $V_p$ ) e Diâmetro Médio dos Poros**

As medidas de volume específico dos poros dos suportes utilizados e de algumas FE preparadas, foram feitas no Porosímetro Micromeritics, modelo 9310. O aparelho faz análise de intrusão e extrusão de mercúrio metálico e fornece as respectivas curvas. O aparelho se encontra interfaciado com um micro computador (PC-386), que fornece diretamente os resultados de volume médio dos poros.

### III.f.1.3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A versatilidade da microscopia eletrônica de varredura (MEV) deriva da grande gama de interações possíveis entre os elétrons do feixe e a amostra. Tais interações podem fornecer informações acerca da composição e topografia de uma amostra, entre outras. As interações entre os elétrons e a amostra podem ser divididas em duas categorias:

Espalhamento elástico, onde as trajetórias dos elétrons do feixe são alteradas sem que ocorra mudança na energia cinética dos elétrons.

Espalhamento inelástico, que resulta na perda de energia cinética dos elétrons do feixe para os átomos da amostra, levando à produção de elétrons secundários.

Quando um feixe de elétrons incide sobre uma amostra plana, geralmente parte dos elétrons escapa da amostra através do mesmo caminho pelo qual penetrou nela. Estes elétrons re-emergentes são denominados *elétrons retroespalhados*. Estritamente, consideram-se retroespalhados os elétrons que sofrem espalhamento elástico e cujas trajetórias são alteradas por mais de 90 graus a partir da direção inicial do seu movimento.

Os elétrons retroespalhados fornecem um sinal extremamente útil para a formação de imagens em MEV, pois respondem à composição (contraste por composição), à inclinação local da superfície (contraste topográfico), à cristalografia da amostra e a campos magnéticos internos da amostra.

Os elétrons secundários são aqueles ejetados da amostra como conseqüência de um choque inelástico, ou seja, quando há transferência de energia do elétron incidente para um átomo da amostra. Estes elétrons secundários são definidos exclusivamente em função de sua energia

cinética, e considera-se secundários todos os elétrons com energia inferior a 50 eV, uma escolha arbitrária. Os elétrons secundários são mais sensíveis à topografia da amostra, e geralmente fornecem uma imagem das características topográficas da amostra. A sensibilidade à composição é muito menor do que a observada para elétrons retroespalhados.

Geralmente, quando se deseja obter informações acerca da superfície da amostra, obtém-se uma imagem a partir de elétrons secundários, e quando se necessita de informação sobre a composição, obtém-se imagens a partir de elétrons retroespalhados<sup>[49]</sup>.

As amostras de sílica nua, sílica zirconizada e das FE preparadas, foram metalizadas com ouro e as MEV foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-300, com o objetivo de verificar a morfologia das partículas e as suas respectivas superfícies.

#### **III.f.1.4) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A microscopia eletrônica de transmissão produz uma imagem de projeção, na qual ocorre a formação de contrastes produzindo sombras quando um objeto é colocado na frente da fonte de emissão de elétrons<sup>[50]</sup>.

A MET da sílica zirconizada e de algumas FE preparadas, foi feita em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-902, a fim de se verificar como o polímero recobre a superfície da sílica.

#### **III.f.1.5) Análise Termogravimétrica (ATG)**

Análises termogravimétricas dos suportes e de algumas FE preparadas foram feitas para verificar as suas respectivas estabilidades térmicas. Para

isso, utilizou-se o analisador termogravimétrico (Du Pont, modelo 9900, módulo 951) onde, através de uma micro balança, se obteve a porcentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio, com velocidade constante de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , desde a temperatura ambiente até  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **III.f.1.6) Fluorescência de Raios-X**

Fluorescência é um processo importante de emissão no qual os átomos ou moléculas são excitados pela absorção de um feixe de radiação eletromagnética. As espécies excitadas então relaxam para o estado padrão, transferindo seu excesso de energia como fótons<sup>[51]</sup>.

Quando um elétron é expelido de um sólido, um elétron de maior energia pode cair no orbital vago e emitir um fóton de Raios-X para produzir fluorescência de Raios-X<sup>[52]</sup>.

As análises de Fluorescência de Raios-X foram feitas no Tracer X-Ray, modelo Spectrace 5000, para se determinar a quantidade de zircônio presente na sílica zirconizada. A quantidade de zircônio na amostra foi obtida pela interpolação do valor lido para a amostra em uma curva analítica construída com diferentes quantidades de óxido de zircônio (zircônia) em sílica.

### **III.f.1.7) Espectroscopia Fotoeletrônica de Excitação por Raios-X (XPS)**

A Espectroscopia Fotoeletrônica de Excitação por Raios-X, XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy), é uma técnica de superfície, empregada na

análise de vários tipos de amostras como metais, polímeros, cerâmicas, compósitos, semicondutores e amostras biológicas na forma de lâminas, fibras, pós, partículas ou filmes.

A profundidade de alcance da técnica é função de energia cinética do elétron e do tipo de material analisado. Como exemplo, a profundidade de alcance é em média de 0,5 a 2 nm para metais, 2 a 3 nm para compostos inorgânicos e 5 a 100 nm para compostos orgânicos. O princípio básico da técnica de espectroscopia fotoeletrônica de excitação por raios-X é a ionização da molécula ou átomo da amostra através de um feixe de fótons monoenergético e na medida da energia cinética do elétron ejetado. A Figura 12 ilustra a conservação de energia para o processo de fotoemissão, e requer que:

$$E_{h\nu} = E_{EL} + E_{EC} + \phi_{sp}$$

onde:  $E_{h\nu}$  é a energia do raio-X,  $E_{EL}$  é a energia de ligação do elétron de determinado nível num composto,  $E_{EC}$  é a energia cinética do fotoelétron, e  $\phi_{sp}$  é a função de trabalho do espectrômetro.

Um analisador de elétrons varre o espectro da amostra e fornece os valores das energias cinéticas dos fotoelétrons. O valor de  $\phi_{sp}$  é conhecido ou assume-se como sendo constante para um dado sistema. A identificação dos elementos presentes na superfície é feita diretamente pela determinação das energias cinéticas dos picos dos fotoelétrons. A intensidade (área integrada do pico fotoelétrico) é proporcional ao número de átomos no volume detectado, permitindo-se portanto obterem informações sobre a composição da superfície<sup>[53]</sup>.

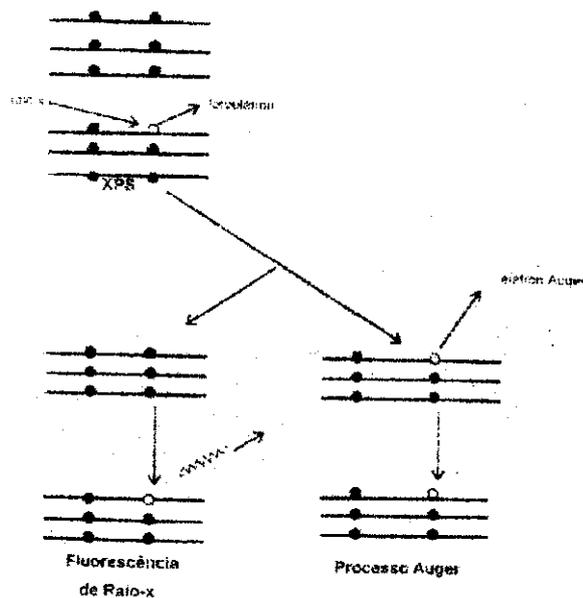


Figura 12 - Princípio de Fotoemissão

Esta técnica foi empregada com a finalidade de caracterizar a presença de óxido de zircônio (IV) na superfície da sílica gel. Também foram obtidas as proporções atômicas dos elementos na superfície, até a profundidade de 30 Å ( $3 \times 10^{-9}$  m).

As medidas foram feitas com o espectrofotômetro XPS - 36 de McPherson Co. Como fonte para excitação da amostra utilizou-se a radiação alfa ( $\alpha$ ) de energia igual a 1486,6 eV, mantendo-se a pressão na câmara de análise em  $10^{-5}$  Pa. Como referência foi usada a energia de ligação C1s (C-C, C-H) = 284,6 eV<sup>[54]</sup>.

### III.f.1.8) Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros na região do Infravermelho (IV) foram obtidos no aparelho Perkin Elmer modelo FT-IR 1600, no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , a fim de verificar o grau de recobrimento dos grupos silanóis da sílica e a

existência ou não de PMOS, através da presença de determinados grupos funcionais que os caracterizam. A câmara de amostra foi purgada com nitrogênio seco por cerca de 1 minuto antes da obtenção de cada espectro.

Os espectros das amostras sólidas foram obtidos com as amostras prensadas na forma de pastilhas de KBr com concentração de 0,5% (m/m).

#### **III.f.1.8.a) Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFTS)**

Nos últimos anos, muitos autores vêm se interessando pela técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa com Transformada de Fourier, mais conhecida por DRIFTS, devido aos ótimos resultados que ela vem apresentando, principalmente no estudo de sólidos rugosos, tais como catalisadores heterogêneos, semicondutores e materiais cerâmicos, entre outros. A técnica é basicamente usada na análise qualitativa de amostras difíceis de serem analisadas através de técnicas convencionais de infravermelho, tais como semicondutores e pós escuros<sup>[49,55]</sup>.

A técnica de DRIFTS se baseia na obtenção de um espectro a partir da radiação infravermelha refletida por uma amostra. Um "refletor difuso" perfeito é aquele que reflete a radiação igualmente em todas as direções. Porém, apenas uma parte desta radiação refletida pode ser detectada e analisada, sendo portanto necessário o uso de um espectrômetro de alta sensibilidade. Geralmente, um espectrômetro FTIR com um detector apropriado pode ser utilizado. Para se obter o espectro de reflectância, usa-se um acessório que pode ser encaixado no porta amostras do aparelho. Nesse trabalho, para obtenção dos espectros usou-se um acessório JASCO.

Um "background" adequado deve ser escolhido, e geralmente usa-se o KBr, já que este é normalmente empregado como dispersante de amostras sólidas.

Os espectros foram feitos com os padrões puros, sem diluição, usando-se KBr puro como "background". Para cada espectro foram feitas 64 acumulações, aumentando-se assim a relação sinal/ruído.

### **III.f.2) Teste Químico**

#### **III.f.2.1) Análise Elementar**

A análise elementar foi feita em um aparelho Perkin-Elmer, modelo 2400, para determinar o teor total de carbono nas FE preparadas. Também fizeram-se a análise elementar dos suportes utilizados para verificar da ausência ou não de compostos orgânicos.

O método utilizado baseia-se na conversão de carbono a  $\text{CO}_2$ , através da combustão, que é então medido em função de sua condutividade térmica.

### **III.f.3) Avaliação Cromatográfica das Colunas**

#### **III.f.3.1) Sistema Cromatográfico**

Para avaliar as colunas preparadas, usou-se um cromatógrafo a líquido cujo esquema encontra-se na Figura 13 e é composto das seguintes partes:

Bomba de alta pressão, Waters 510, de pistão duplo trabalhando em vazão constante.

Injetor Rheodyne modelo 8125 com amostrador (loop) de 5  $\mu$ L

Detector Espectrofotométrico de absorção no UV/Vis de comprimento de onda variável, ISCO modelo V4 Absorbance Detector. O comprimento de onda foi ajustado em 254 nm. Volume da cela 3,2  $\mu$ L.

Microcomputador PC-AT 486, Equipado com uma placa conversora A-D modelo DT2804, usando o Software ChromPerfect (para MS-DOS) da Justice Innovations, Inc.

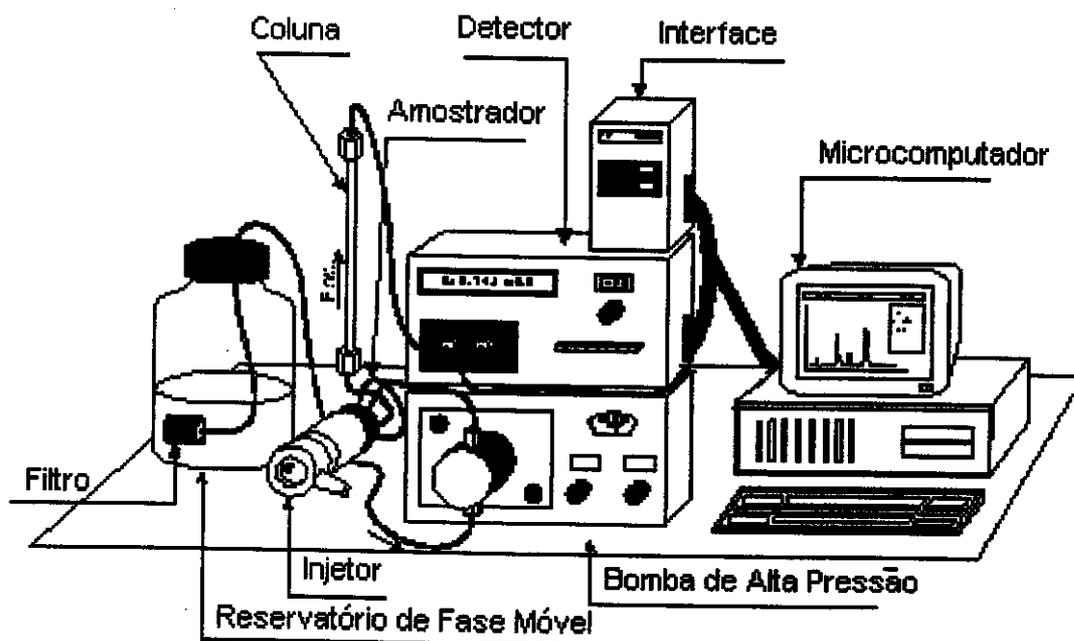


Figura 13 - Ilustração Mostrando um Cromatógrafo a Líquido.

### **III.f.3.2) Misturas Testes e Parâmetros Utilizados na Avaliação das Colunas**

Para a avaliação das colunas, foram utilizadas duas misturas testes sintéticas:

- amostra 1: acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno dissolvidos na fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v).
- amostra 2: anilina, N,N-dimetilanilina (N,N - DMA) e N,N-dietilanilina (N,N - DEA) dissolvidos na fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v).

A escolha da amostra 1 foi baseada em trabalhos anteriores<sup>[2,31,34]</sup> além de coincidir com misturas empregadas por alguns fabricantes<sup>[56]</sup> nos testes de suas colunas. Os parâmetros cromatográficos: eficiência (N e N/m), fator de retenção (k) e fator de assimetria ( $A_{s10}$ ) foram calculados para o pico do naftaleno e, resolução ( $R_s$ ) e fator de separação ( $\alpha$ ) foram calculados para o par de picos tolueno-naftaleno.

A amostra 2 teve como objetivo verificar o desempenho das colunas recheadas com as FE preparadas a partir de sílica e de sílica zirconizada, frente a uma amostra contendo componentes básicos. A amostra também é usada por alguns fabricantes de colunas comerciais<sup>[56]</sup>. Para a N,N - DEA foram calculados a eficiência, fator de retenção e fator de assimetria e para o par N,N - DMA e N,N - DEA foram calculados o fator de separação e a resolução.

### **III.f.3.3) Preparação e Escolha da Composição da Fase Móvel.**

Inicialmente foi usada como fase móvel uma mistura de metanol (MeOH) e água deionizada (70/30, v/v), preparada sempre da mesma

forma: em uma proveta de 1000 mL adicionava-se 700 mL de metanol (grau cromatográfico, previamente filtrado em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$ ) e completava-se o volume da proveta com água deionizada filtrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Esta proporção foi escolhida tendo como base os trabalhos anteriores do nosso grupo <sup>[23,31,34,46]</sup> na separação da mesma mistura sintética utilizada no desenvolvimento desta pesquisa.

A mudança na composição da fase móvel, quase sempre, não resultou em um grande aumento na eficiência da coluna, assim fixou-se a composição da fase móvel como sendo MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v) e, quando as colunas mostravam resultados ruins eram reenchidas e reavaliadas.

#### **III.f.3.4) Condicionamento das Colunas Cromatográficas**

Depois de recheada é importante que se condicione a coluna, para que ocorra um equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Assim, após o enchimento, as colunas foram condicionadas com a fase móvel a ser usada, a uma vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, por pelo menos quatro horas. O condicionamento foi feito sem ligar a coluna ao detector para evitar que qualquer tipo de material, eventualmente saindo da coluna (pequenas partículas, excesso de polímero), prejudicasse o bom funcionamento do detector<sup>[46]</sup>. Após o condicionamento, a coluna está pronta para análise e pode ser conectada ao detector.

Sempre que a coluna permanecia em desuso por mais de uma semana ou se passava pela coluna uma solução diferente da fase móvel (testes de lavagem), a coluna era condicionada da mesma forma que uma coluna recém preparada.

### III.f.3.5) Testes de Estabilidade Química

Depois que as colunas foram avaliadas com as misturas 1 e 2 e mostraram desempenho cromatográfico satisfatório, foram realizados os testes de estabilidade química.

As colunas foram lavadas com a fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v) fazendo-se passar pela coluna 500 vezes o volume interno da coluna, depois a coluna era conectada ao detector e fazia-se a análise da coluna com as misturas 1 e 2. Repetia-se o procedimento de lavagem e após a passagem de 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 vezes o volume da coluna, fazia-se uma avaliação da coluna. Nestes testes utilizou-se aproximadamente o volume equivalente a 2 meses de trabalho, operando-se na vazão ótima em análise de rotina.

As colunas também foram testadas quanto a estabilidade frente a uma solução fortemente alcalina. Para tanto, preparou-se uma solução tampão NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de pH 10,6. Esta solução tampão foi usada na preparação da fase móvel alcalina em substituição da água, ou seja, numa proveta de 1000 mL adicionaram-se 700 mL de MeOH e completou-se o volume até 1000 mL com a solução tampão. A concentração das substâncias utilizadas na preparação do tampão foram: [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] = 1 mol L<sup>-1</sup> e [NH<sub>3</sub>] = 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

## IV) Resultados e Discussão

### IV.a) Testes Físicos

#### IV.a.1) Medidas de Área Superficial Específica ( $S_{BET}$ ), Volume Específico de Poro e Diâmetro Médio dos Poros

Observa-se na Tabela 1, onde estão apresentados os valores de  $S_{BET}$ , volume dos poros e diâmetro médio dos poros dos suportes e das FE preparadas, uma drástica redução da área superficial das FE preparadas que se deve ao recobrimento causado pelo polímero que formou um filme sobre a superfície obstruindo a entrada dos poros. Tal suposição é também amparada pelos resultados de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que mostram uma camada de polímero sobre a superfície do suporte.

Nota-se que a área superficial não é tão diferente nos dois suportes utilizados, e talvez tenha aumentado um pouco para sílica zirconizada devido a formação de domínios de óxido de zircônio sobre a superfície da sílica tornando-a mais irregular.

Tabela 1- Medida de Área Superficial Específica , Volume de Poros e Diâmetro Médio dos Poros dos Suportes Usados e das FE preparadas.

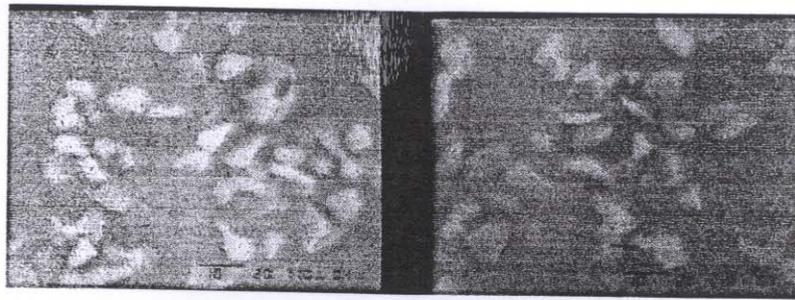
Amostra	Área Superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Volume dos Poros (mL g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio dos poros (nm)
Sílica Gel nua	264	1,9	13,8
Sílica Zirconizada	279	2,5	8,4
Sílica + 50% (m/m) PMOS	27	1,1	9,3
Sílica Zirconizada + 50% (m/m) PMOS	0,9	1,1	9,3

A Tabela 1 mostra um aumento do volume dos poros após a zirconização causado provavelmente pela forma com que a zircônia se distribui na superfície.

Observa-se na sílica nua e na sílica zirconizada que tanto o volume como o diâmetro médio dos poros foram alterados após a adição de PMOS, que deve ter mudado a geometria dos poros após a deposição do polímero.

#### IV.a.2) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

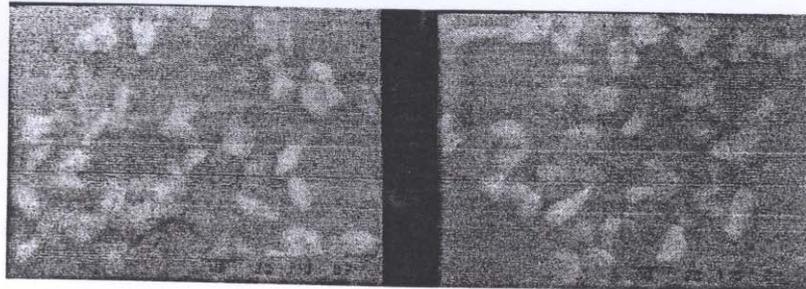
A MEV (Figura 14 e Figura 15) mostra que as partículas utilizadas são bastante irregulares e que a distribuição dos tamanhos das partículas não é uniforme. Os resultados da sonda de raios-X pouco contribuíram, já que o zircônio apresenta sinal aproximadamente na mesma região que o ouro usado na metalização da amostra, talvez com a "metalização" através de carbono seja possível confirmar, mais uma vez, a presença de zircônio.



A

B

Figura 14 - MEV (1500x). A - Sílica nua ; B - Sílica + PMOS



A

B

Figura 15 - MEV(1500x). A - Sílica zirconizada; B - Sílica Zirconizada + PMOS

#### IV.a.3) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A MET das partículas foi realizada apenas para um número muito restrito de amostras, porque as partículas são muito grandes para o amostrador, então não foi possível analisar todas amostras desejadas. Analisando-se as Figura 16 e Figura 17 verifica-se que a distribuição do tamanho de partículas é muito irregular, como se havia observado nas micrografias de varredura (MEV, Figura 14 e Figura 15). Uma observação detalhada da Figura 16, permite verificar que se forma uma camada de polímero sobre a superfície da sílica e que esta camada provoca a formação de aglomerados na região fotografada.



Figura 16 - MET de Sílica + PMOS

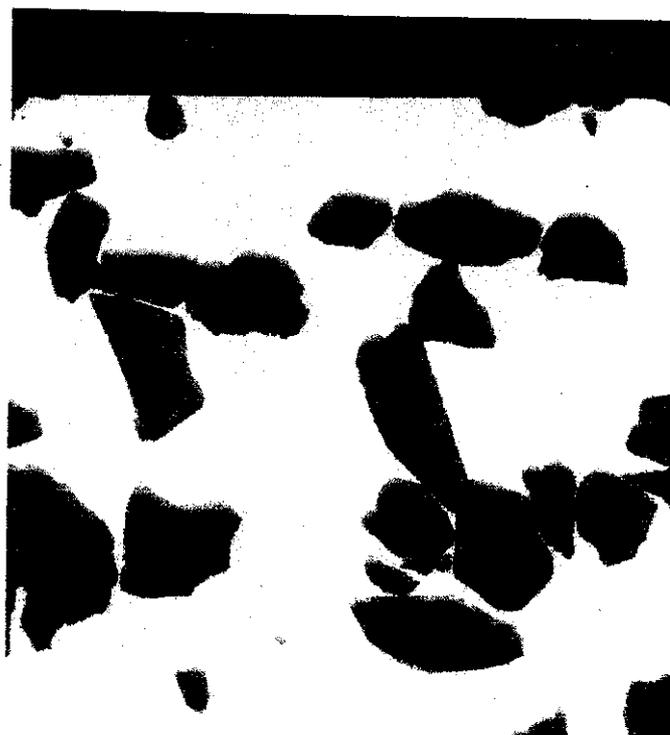


Figura 17 - MET de Sílica Zirconizada

#### **IV.a.4) Análise Termogravimétrica (ATG)**

Observando-se a Figura 18 nota-se que os suportes usados na preparação das FE são extremamente estáveis, mesmo à temperaturas muito elevadas. A sílica zirconizada tem estabilidade térmica praticamente idêntica à sílica nua e mesmo à temperaturas muito elevadas não ocorre sequer 5% de perda de massa.

Estudos anteriores no nosso grupo<sup>[2]</sup>, já haviam mostrado a boa estabilidade térmica de FE com PMOS sorvido, e que só ocorrem pronunciadas alterações na massa acima de 250 °C (Figura 19). Como, em CLAE, as FE são geralmente usadas a temperatura ambiente ou à temperaturas até 80 °C, as amostras analisadas foram consideradas estáveis termicamente sem apresentar degradação do polímero sorvido. A pequena perda de massa observada nos suportes em temperaturas inferiores a 100 °C deve-se à eliminação de água. Na análise das FE não ocorre essa perda porque antes da preparação da fase faz-se a ativação, aquecimento do suporte a 150 °C por 24 h, quando é eliminada toda água fisicamente adsorvida.

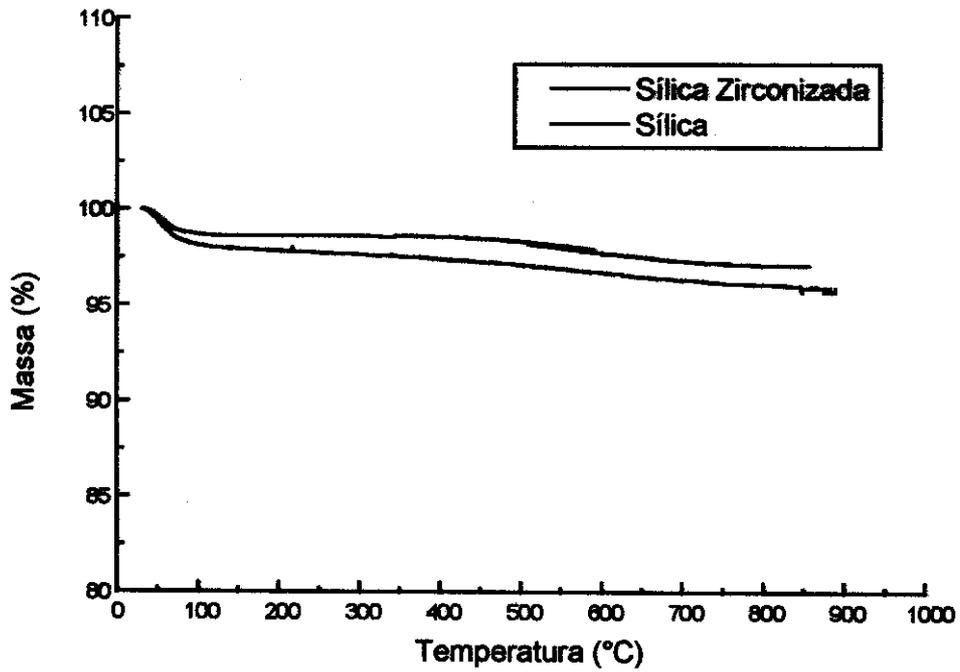


Figura 18 - ATG dos Suportes Cromatográficos

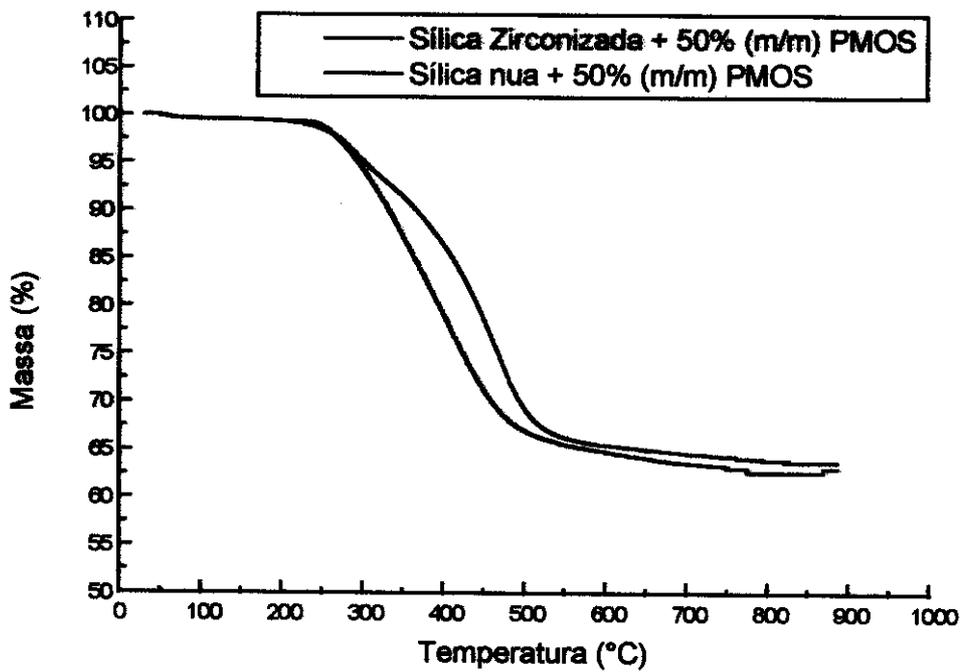


Figura 19 - ATG das FE Preparadas

#### IV.a.5) Avaliação da Zirconização do Suporte

A análise foi feita por espectrofotometria no visível e os resultados obtidos estão na Tabela 2:

Tabela 2 - Concentração da solução de [Cr]VI quando em contato com os suportes utilizados

Solução	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> adicionada	6x10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> após contato com a sílica zirconizada	1,35x10 <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> após o contato com a sílica nua	5,89x10 <sup>-4</sup>

Portanto, fica assim comprovada, devido a adsorção do cromo da solução estoque adicionada, a zirconização da sílica gel que foi utilizada como suporte cromatográfico neste trabalho.

#### IV.a.6) Fluorescência de Raios-X

A fluorescência de raios-X indicou que há na amostra de sílica zirconizada analisada 1,48% de zircônio (0,162 mmol g<sup>-1</sup>).

Considerando que a sílica é porosa e que os espectros no infravermelho de sílica zirconizada ainda mostram a presença de grupos silanóis conclui-se que a zircônia se distribui de maneira irregular, ocupando

os poros e a superfície, e não se distribuindo homogeneamente sobre a superfície da sílica. Isso é comprovado verificando os diâmetros médios dos poros que são reduzidos após a zirconização.

### **IV.a.7) Espectroscopia Fotoeletrônica de Excitação por Raios-X (XPS)**

O valor obtido por XPS para a razão atômica Zr/Si foi de 0,01. Como essa relação é muito baixa, conclui-se que o zircônio não está contido somente na superfície, podendo encontrar-se no interior da partícula de sílica, mais especificamente no interior dos poros das partículas.

Também pela análise de XPS, observa-se que há zircônio somente em forma tetraédrica, pois os átomos de zircônio têm uma energia de ligação de 183 eV.

### **IV.a.8) Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

Como visto anteriormente, os grupos silanóis livres prejudicam as propriedades cromatográficas de um material a ser usado como recheio de coluna em cromatografia líquida do tipo fase reversa. Então, o principal objetivo do estudo dos espectros de IV, foi verificar a presença e intensidade da banda em  $973\text{ cm}^{-1}$ , característica de grupos silanóis livres sobre a superfície de sílica<sup>[58]</sup>.

Estudos anteriores<sup>[34,36]</sup> mostraram que os espectros do polímero e o do suporte, quando somados, fornecem o espectro dos materiais de recheio preparados (polímero+suporte) e, que a intensidade da banda em  $973\text{ cm}^{-1}$ , atribuída aos grupos silanóis livres, diminui com o aumento da porcentagem de polímero sobre o suporte. Confirmou-se essa verificação em suportes de

sílica nua (Figura 20), e observou-se que o espectro da sílica zirconizada (sem polímero) (Figura 21) também apresenta uma pronunciada redução dessa banda, comparável em termos qualitativos, a diminuição observada quando da adição de 50% (m/m) de PMOS sobre a sílica nua (Figura 22).

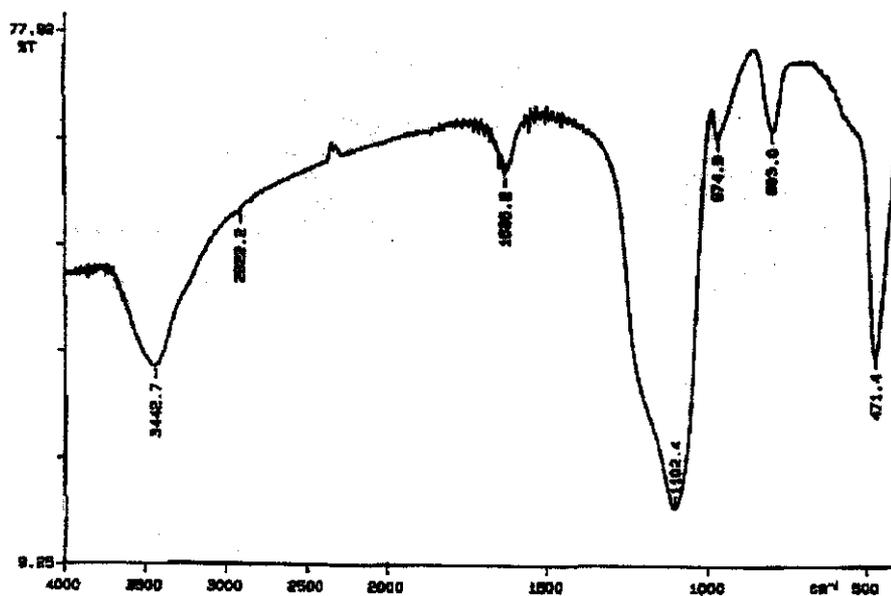


Figura 20 - Espectro no Infravermelho da Sílica nua

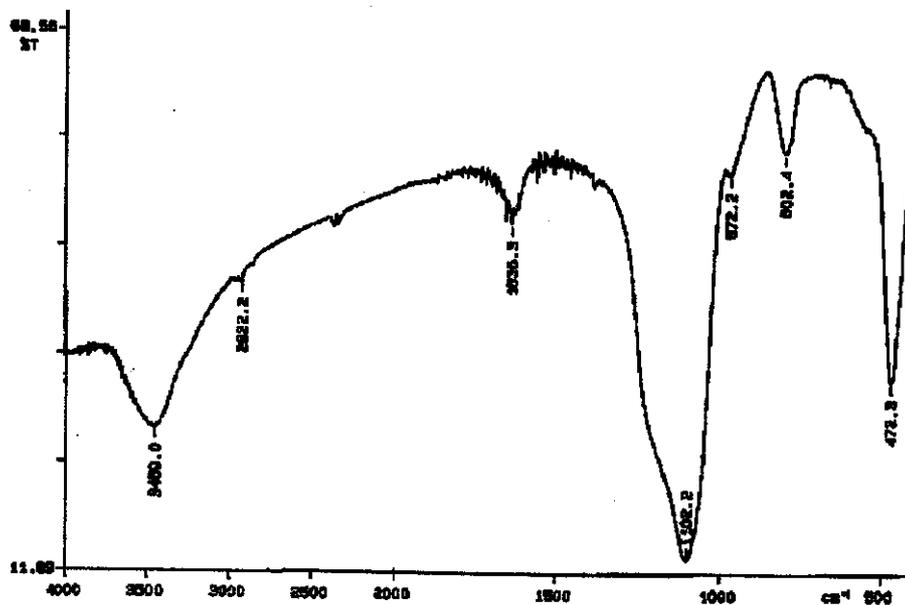


Figura 21 - Espectro no Infravermelho de Sílica Zirconizada

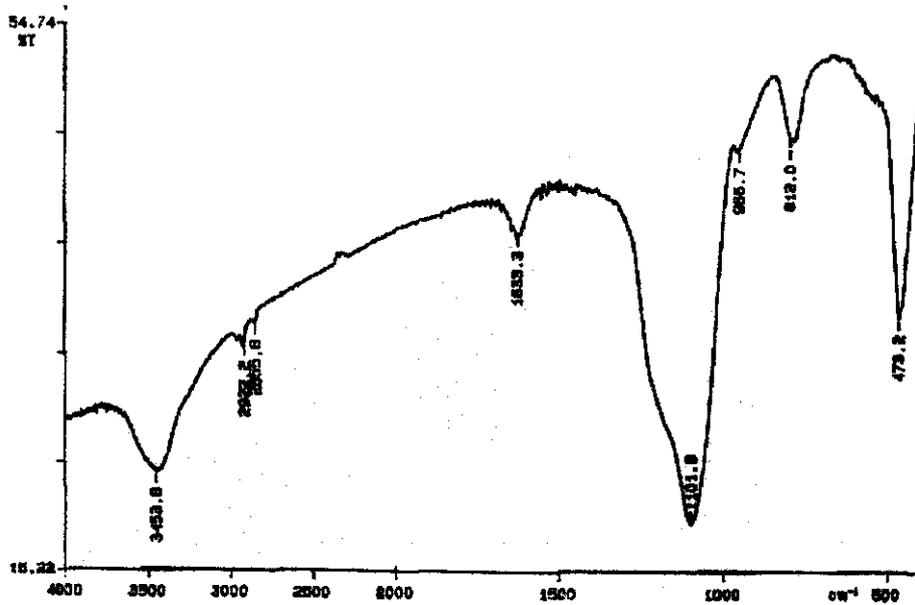


Figura 22 - Espectro no Infravermelho de Sílica + 50% (m/m) de PMOS Sorvido

Como foi observado nos espectros uma intensidade de transmissão muito baixa, realizou-se então DRIFTS das amostras.

#### IV.a.8.1) Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa

Nas Figura 23, Figura 24 e Figura 25 observam-se os espectros de DRIFTS respectivamente de sílica nua e sílica zirconizada, sílica + 50% (m/m) PMOS e finalmente sílica zirconizada e sílica zirconizada + 50% (m/m) PMOS. Na Tabela 3 encontram-se as atribuições das bandas observadas.

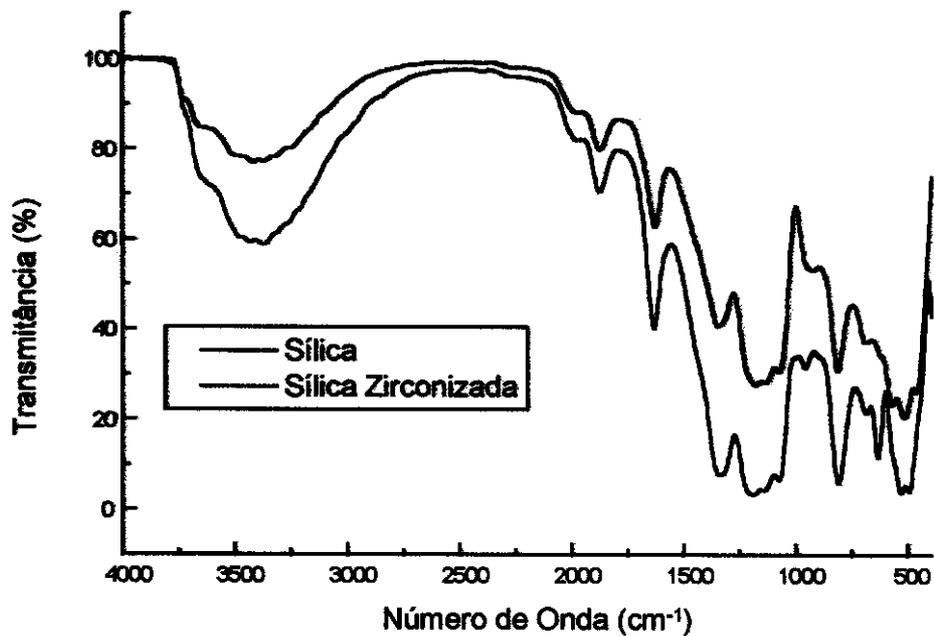


Figura 23 - Espectros de DRIFTS dos Suportes Cromatográficos.

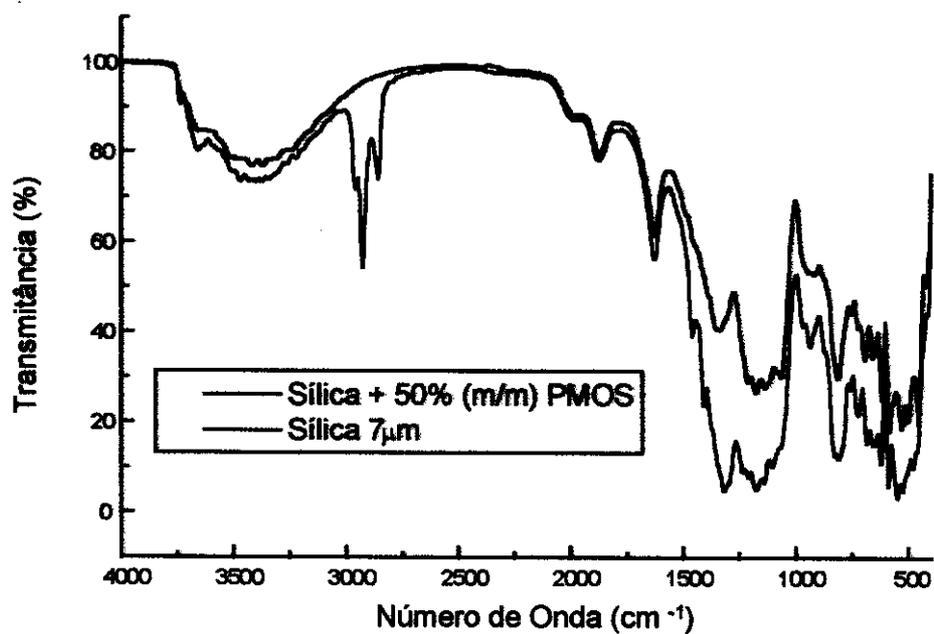


Figura 24 - Espectros de DRIFTS de Sílica e de Sílica + 50% (m/m) PMOS.

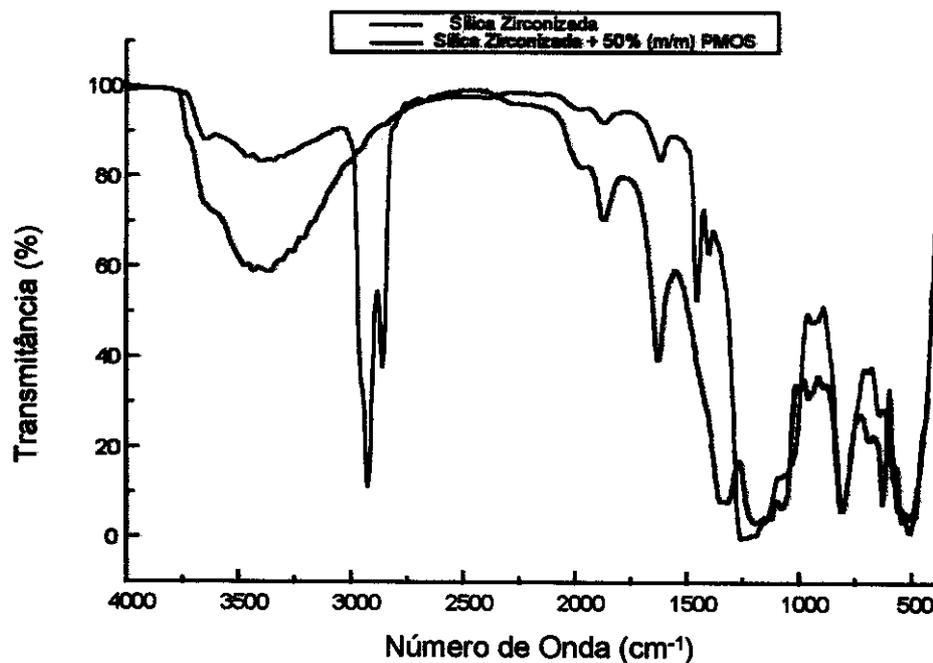


Figura 25 - Espectros de DRIFTS de Sílica Zirconizada e de Sílica Zirconizada + 50% (m/m) de PMOS.

Tabela 3 - Atribuições das bandas observadas no espectro FTIR e DRIFTS dos suportes e suportes + PMOS.

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3370	$\nu$ (-O-H)
2960	$\nu$ ( $\equiv$ C-H) <sub>ass.</sub>
2910	$\nu$ ( $\equiv$ C-H) <sub>sim.</sub>
1100 a 1030	$\nu$ ( $\equiv$ Si-O-Si $\equiv$ )
973	$\nu$ $\equiv$ Si-OH
820	$\rho$ (-CH <sub>3</sub> ) <sub>ass.</sub>

Onde:

$\nu$  = estiramento

$\rho$  = deformação

## IV.b) Teste Químico:

### IV.b.1) Análise Elementar

A análise elementar dos suportes, Tabela 4, confirmaram a ausência de compostos orgânicos residuais na sua preparação.

Os resultados de porcentagem de carbono nas FE mostraram boa concordância com as quantidades de PMOS utilizadas na preparação das FE.

Tabela 4 - Porcentagens de Carbono Obtidas por Análise Elementar.

Amostra	% C
Sílica nua	0,37
Sílica Zirconizada	0,23
Sílica nua + 50 % (m/m) PMOS	31,60
Sílica nua + 50% (m/m) PMOS, após enchimento da coluna	7,89
Sílica Zirconizada + 50% (m/m) PMOS	32,08
Sílica Zirconizada + 50% (m/m) PMOS, após o enchimento da coluna	11,60

A partir destes valores de análise elementar, podem-se fazer estimativas para o cálculo da espessura da camada de PMOS que recobre as partículas de suporte. Como exemplo pode-se usar a sílica + 50% (m/m) PMOS antes do enchimento para um cálculo aproximado:

Sílica nua + 50 % (m/m) PMOS, tem-se:

C=31,60 %

Em 100g de amostra, há 31,60 g de carbono. PMOS= $(\text{CH}_3)_3\text{Si-O}[\text{CH}_3\text{SiO}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3]_n\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$ , portanto a massa molar da unidade monomérica será  $172 \text{ g mol}^{-1}$ .

Em 172 g de PMOS, tem-se 108g de carbono, portanto 31,60 g de carbono correspondem a 50,33 g de PMOS, ou 50,33%. Esse cálculo mostra boa concordância com a massa de PMOS adicionada na preparação.

Se for feita uma aproximação, tal que as partículas possam ser consideradas esféricas, pode-se fazer uma ilustração do cálculo da espessura da camada de polímero sobre as partículas de sílica (Figura 26). Considerando-se o tamanho das partículas da ordem de  $7 \mu\text{m}$ , tem-se portanto, a seguinte situação:

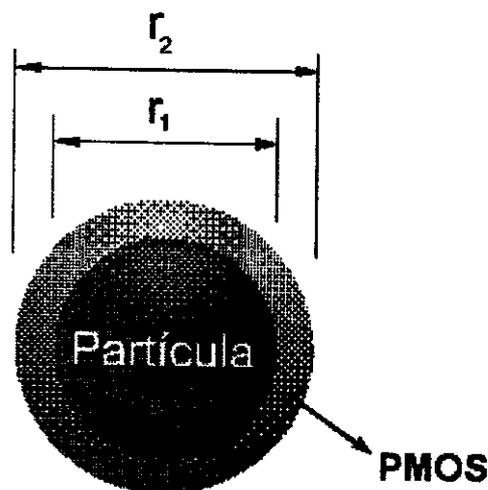


Figura 26 - Uma partícula hipotética revestida com PMOS.

Tem-se  $r_1 = 3,5 \times 10^{-6} \text{ m}$ , e deve-se encontrar  $r_2$ . A densidade da sílica foi considerada aproximadamente  $2,2 \text{ g cm}^{-3}$ , e a densidade do PMOS é de  $0,91 \text{ g cm}^{-3}$ .

O volume da camada de polímero será:

$$V_p = (4/3)\pi r_2^3 - (4/3)\pi r_1^3$$

O volume da partícula de sílica será  $V_f = 4/3\pi (3,5 \cdot 10^{-6})^3 = 1,79 \cdot 10^{-16} \text{ m}^3$ .

Considerando a densidade ( $\rho$ ) da sílica =  $2,2 \text{ g cm}^{-3} = 2,2 \cdot 10^6 \text{ g m}^{-3}$ , tem-se a massa da partícula:

$$m_s = \rho \cdot V, \text{ ou } m_s = 2,2 \cdot 10^6 \cdot 1,79 \cdot 10^{-16} = 3,95 \cdot 10^{-10} \text{ g.}$$

Sabe-se, porém, que esta massa corresponde a 49,67 % do total, partícula + camada de PMOS, pois determinou-se que há 50,33 % de PMOS. Pode-se, portanto, calcular a massa de PMOS presente:

$$\begin{array}{r} 3,95 \cdot 10^{-10} \text{ g} \text{ ----- } 49,67\% \\ m_p \text{ ----- } 50,33\% \end{array}$$

Portanto, a massa de PMOS ( $m_p$ ) será de  $4,00 \cdot 10^{-10} \text{ g}$ . A densidade do PMOS é de  $9,1 \cdot 10^5 \text{ g m}^{-3}$ , portanto o volume de PMOS presente será :  $V_p = 4,40 \cdot 10^{-16} \text{ m}^3$ .

Pode-se agora calcular  $r_2$ :

$V_p = (4/3)\pi r_2^3 - 1,79 \cdot 10^{-16}$ , de onde se tem que  $r_2 = 5,29 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ . A espessura da camada será então  $r_2 - r_1 = 1,79 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ , ou  $1,79 \text{ }\mu\text{m}$ . O que parece concordante com as observações de MET nas quais se observa uma camada de polímero sobre a superfície do suporte.

Este tipo de cálculo de espessura do filme baseado nos dados de análise elemental foi desenvolvido por Vichi<sup>[49]</sup>.

Seguindo raciocínio análogo, pode-se estimar que haveria uma camada de zircônia com espessura de  $2,53 \cdot 10^{-3} \text{ }\mu\text{m}$  ou  $25 \text{ \AA}$ , portanto não há zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) suficiente para recobrir as partículas, além disso o tamanho de uma molécula de zircônia é menor que o diâmetro dos poros do suporte,

permitindo que haja zircônia recobrindo os canais dos poros da sílica e na sua superfície. Isto foi confirmado por espectroscopia no infravermelho, onde se continua a observar a banda característica de grupos silanóis na superfície.

Existem outras indagações que também devem ser feitas sobre FE sorvida: como o polímero se distribui entre as partículas, e, como o polímero se distribui nos poros das partículas.

Na Figura 27 pode-se visualizar como o PMOS pode ser distribuído sobre o suporte formando pequenos aglomerados e recobrindo o suporte.

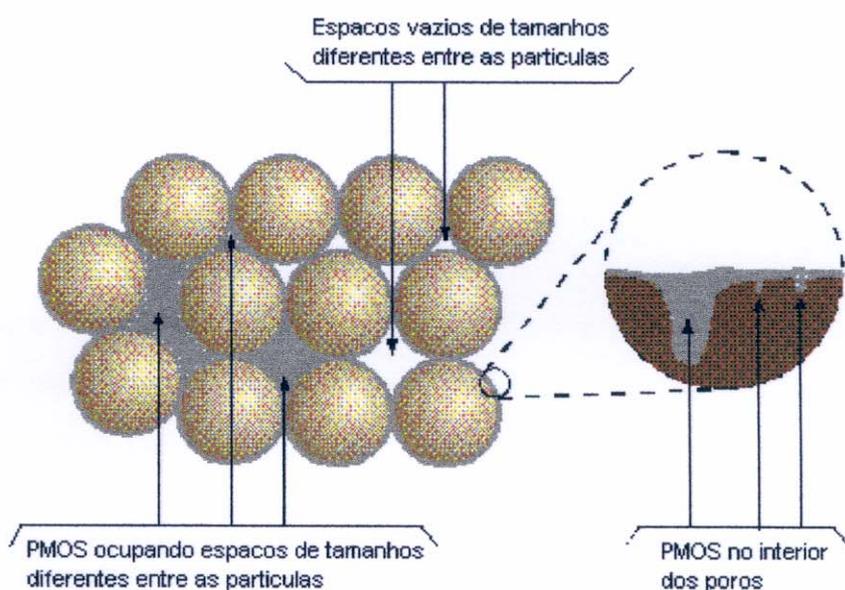


Figura 27 - PMOS sorvido sobre o suporte.

Lembrando-se que as partículas utilizadas são extremamente porosas e os poros podem ser representados por canais de diferentes profundidades, interconectados ou não, pode-se encontrar PMOS sorvido no interior dos poros, como visto na Figura 28. Considerando-se que o PMOS é uma molécula bastante grande, acredita-se ser mais provável que se formem pequenos "plugs" de polímero no interior dos poros ao invés de uma superfície revestida uniformemente.

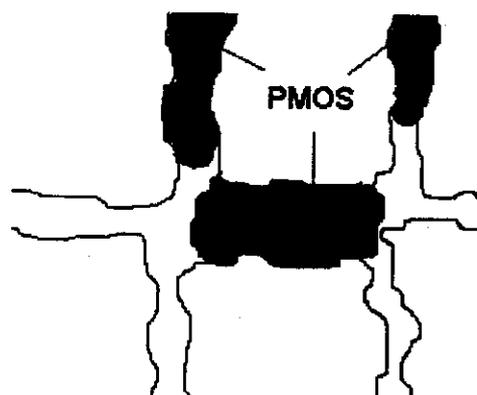


Figura 28 - PMOS no Interior dos Poros do Suporte.

As partículas foram consideradas esféricas nos cálculos e os dados de MEV e MET mostram claramente que são irregulares, portanto, trata-se somente de um modelo qualitativo para se estimar como o PMOS se distribui na FE.

Percebe-se que grande parte do polímero adicionado na preparação é removido nas etapas de enchimento das colunas, condicionamento e avaliação cromatográfica. Porém ainda assim pode-se concluir que, mesmo depois de usada, a coluna ainda possui polímero sorvido suficiente para que se tenha uma fase estacionária do tipo reversa.

Observando-se os valores de %C após o enchimento, verifica-se que grande parte do PMOS adicionado é lixiviado no enchimento da coluna, restando ainda PMOS sobre a superfície e no interior dos poros. Provavelmente o PMOS contido nos poros deve ser mais retido que o existente na superfície, por encontrar-se mais fortemente adsorvido e ser mais difícil de ser arrastado no enchimento com alta pressão.

A zircônia pode se distribuir de maneira análoga, considerando-se os resultados de XPS, pode-se concluir que também existe zircônia no interior dos poros, já que na superfície analisada (30 Å) existe muito pouco zircônio.

## **IV.c) Avaliação Cromatográfica das Colunas**

### **IV.c.1) A Busca da Coluna Perfeita**

Mais de 30 colunas foram preparadas nesse projeto sendo que, aqui somente serão reportadas as de melhor desempenho cromatográfico. Como eram poucos os conjuntos de tubo e conexões disponíveis, assim que uma coluna era testada e não apresentava resultados satisfatórios, era imediatamente esvaziada, portanto, muitas das colunas preparadas não mais existem.

O enchimento de colunas para cromatografia não é tão simples como aparenta, embora o procedimento seja padronizado, colunas diferentes são produzidas em condições de enchimento praticamente idênticas<sup>[24,26]</sup>. Outro fator que prejudicou a qualidade das colunas recheadas, foram as variações no reservatório de enchimento que mudou de forma e volume várias vezes no decorrer do projeto.

A primeira etapa da avaliação cromatográfica consistiu em determinar, através da construção de uma curva de van Deemter (Figura 29), a vazão ótima a ser utilizada na análise das colunas preparadas.

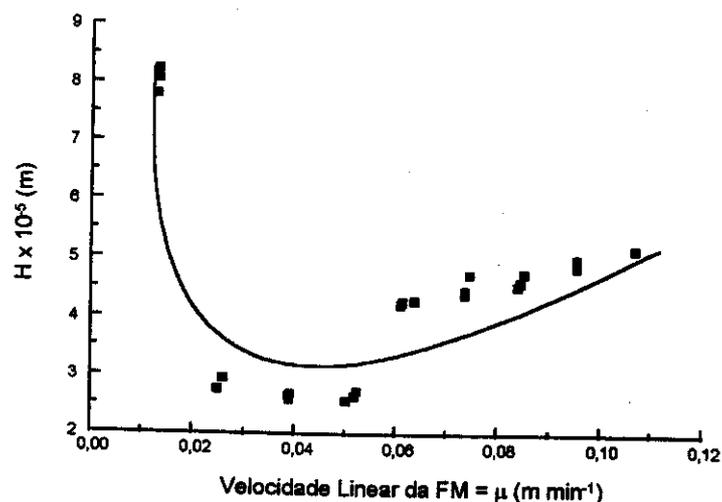


Figura 29- Curva de van Deemter para a coluna contendo Sílica Zirconizada + 50% (m/m) PMOS .

Constatou-se que a vazão ótima das colunas analisadas foi de 0,4 mL min<sup>-1</sup>, com tempo de análise de 9-13 min. Na Tabela 5 pode-se verificar o desempenho das melhores colunas produzidas, usando a amostra 1.

Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos obtidos na análise da mistura 1 com diferentes fases estacionárias.

Fase Estacionária	Parâmetros Cromatográficos <sup>c</sup>				
	N/m (m <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	$\alpha^b$
Sílica 50% (m/m) PMOS	23000	3,5	3,9	2,2	1,3
Sílica + Zr 50% (m/m) PMOS	37500	2,5	2,8	2,7	1,3

<sup>a</sup> Calculado para o naftaleno.

<sup>b</sup> Calculado para o par tolueno-naftaleno.

<sup>c</sup> Condições cromatográficas: Fase móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30 v/v), volume de amostra injetado: 5  $\mu$ L, detecção: UV, 254 nm.

Embora 50% em massa seja uma quantidade apreciável de PMOS, verifica-se que uma considerável parte é arrastada no enchimento da

coluna devido ao solvente de suspensão ( $\text{CCl}_4$ ) que dissolve o PMOS e a alta pressão de enchimento utilizada. O decréscimo da quantidade de PMOS pode ser confirmado verificando-se os dados de análise elementar [ítem IV.b.1) Análise Elementar] onde a %C das FE após o enchimento diminui em relação a porcentagem de carbono das FE preparadas, antes do recheio das colunas.

Nota-se uma menor eficiência da coluna preparada a partir de suporte de sílica nua. Como descrito no início desse ítem, as colunas foram preparadas em épocas distintas e algumas não mais existem, o sistema de enchimento (ítem III.e) Recheio das Colunas Cromatográficas sofreu várias mudanças no reservatório de suspensão, que causaram aumento da assimetria e queda da eficiência das colunas produzidas a partir de FE contendo o mesmo suporte e a mesma quantidade de PMOS depositada. As "altas" assimetrias devem-se em parte à presença de metais na superfície do suporte [58]. Mesmo assim, observam-se cromatogramas (Figura 30 e Figura 31) com picos muito bem resolvidos e colunas com eficiências razoáveis, já que o suporte utilizado é bastante irregular.

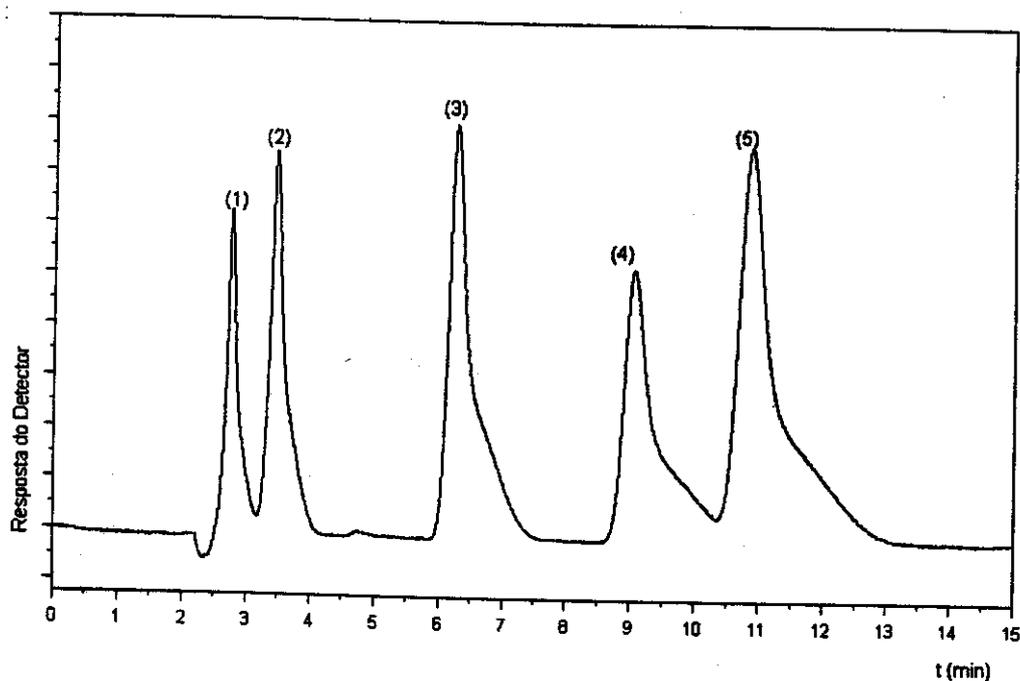


Figura 30 - Cromatograma da mistura 1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno, obtido com a coluna contendo sílica nua + 50 % (m/m) PMOS. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30, v/v); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetado: 5 µL; detecção: UV 254 nm.

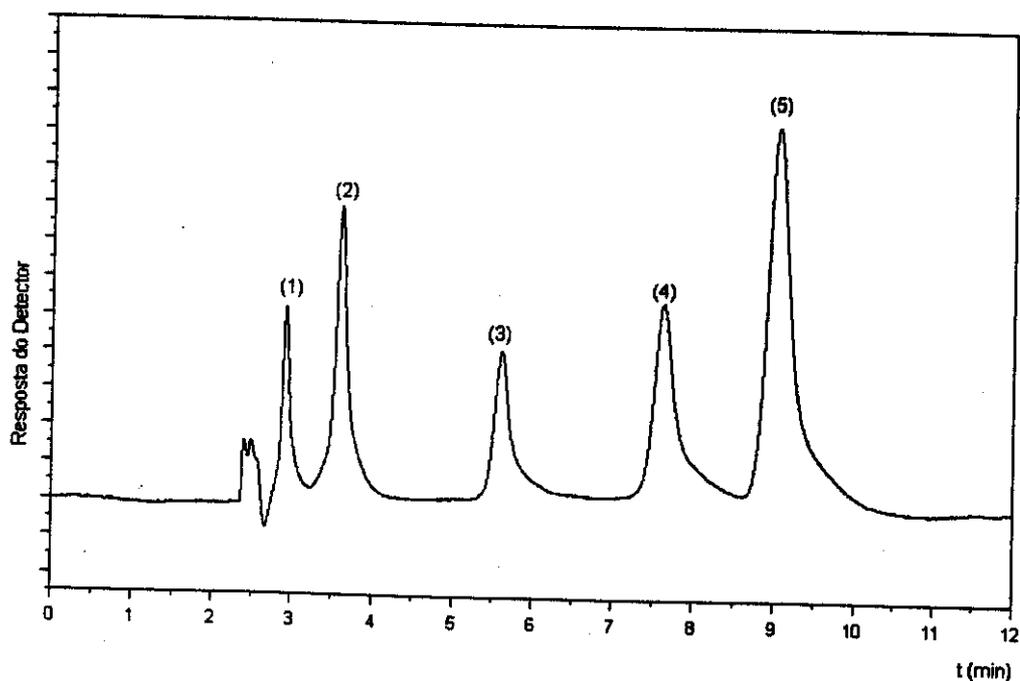


Figura 31 - Cromatograma da mistura 1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno, obtido com a coluna contendo sílica Zirconizada + 50% (m/m) PMOS. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30, v/v); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetado: 5 µL; detecção: UV 254 nm.

A análise da amostra 2, de características básicas, foi feita para as colunas preparadas a partir de suporte de sílica nua e sílica zirconizada.

Os parâmetros cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com a sílica zirconizada + 50 % PMOS (m/m) e Sílica nua + 50% PMOS (m/m) após injeção da mistura 2 e análise na vazão ótima de 0,4 mL min<sup>-1</sup> encontram-se na Tabela 6:

Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos calculados na análise da amostra 2

Fase Estacionária	Parâmetros Cromatográficos <sup>c</sup>				
	N/m (m <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	α <sup>b</sup>
Sílica + 50% (m) PMOS	13000	2,6	4,2	5,4	2,9
Sílica + Zr + 50% (m) PMOS	22400	3,6	3,7	6,7	2,8

<sup>a</sup> Calculado para a N, N, Dietilanilina.

<sup>b</sup> Calculado para o par N, N, Dimetilanilina - N, N, Dietilanilina.

<sup>c</sup> Condições cromatográficas: Fase Móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30 v/v), vazão da FM 0,4 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra injetado: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.

Como pode-se observar verifica-se novamente altos valores de assimetria, embora os picos estejam bem separados. Entretanto, por se tratar de uma amostra básica esperava-se um maior aumento no fator de assimetria em relação à análise da mistura 1, composta por analitos neutros de polaridade variada (Tabela 5), porém isso não ocorreu, mostrando que a zirconização do suporte torna-o mais resistente à interações com amostras básicas.

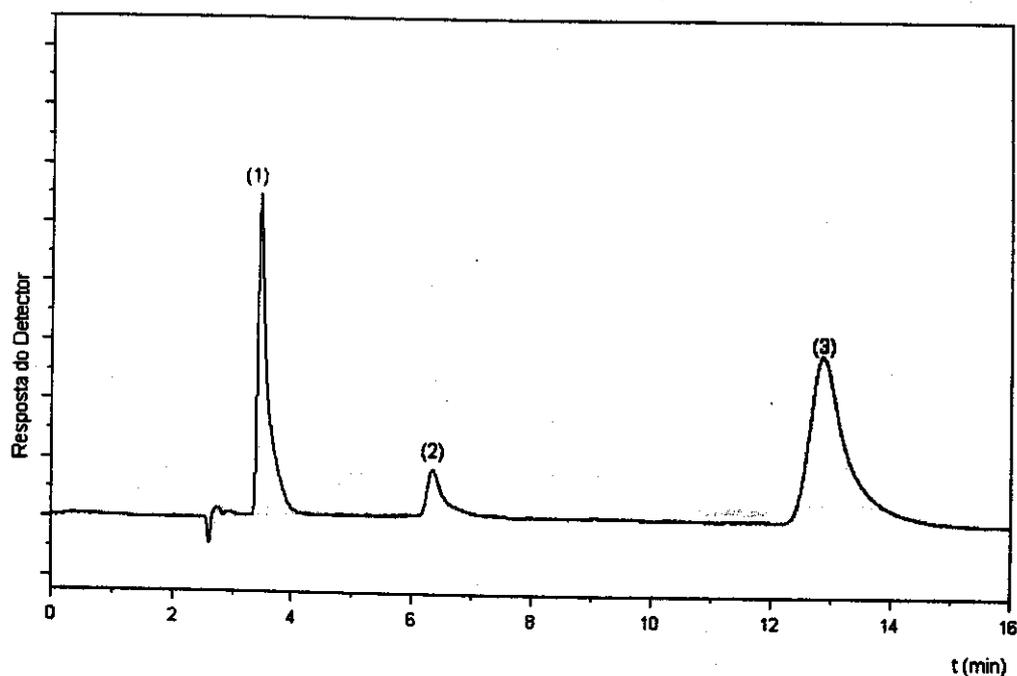


Figura 32 - Cromatograma da mistura 2: (1) anilina, (2) N, N, Dimetilanilina e (3) N, N, Dietilanilina, obtido com a coluna contendo sílica nua + 50 % (m/m) PMOS. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30, v/v); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetado: 5 µL; detecção: UV 254 nm.

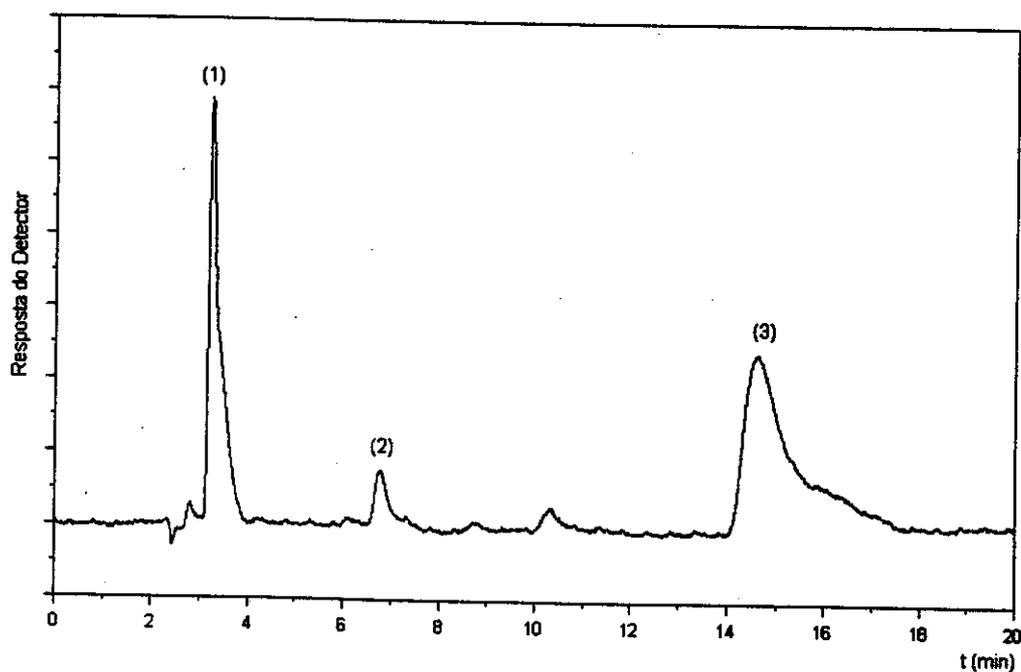


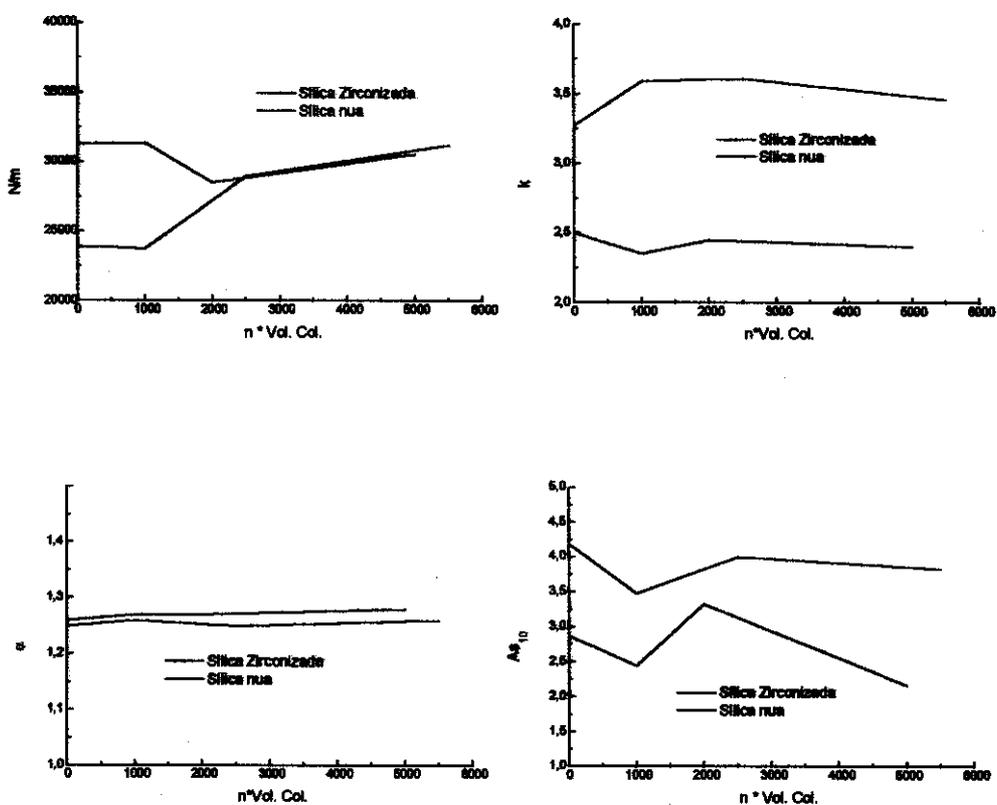
Figura 33 - Cromatograma da mistura 2: (1) anilina, (2) N, N, Dimetilanilina e (3) N, N, Dietilanilina, obtido com a coluna contendo sílica Zirconizada + 50 % (m/m) PMOS. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30, v/v); vazão 0,4 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetado: 5 µL; detecção: UV 254 nm.

**IV.c.2) Testes de Estabilidade Química**

**IV.c.2.1) Lavagem com a Fase Móvel Levemente Ácida**

As colunas contendo FE preparadas a partir de suporte de sílica nua e suporte de sílica zirconizada foram submetidas aos testes de lavagem com a fase móvel utilizada (levemente ácida).

Na Figura 34, pode-se verificar que a passagem de grandes quantidades de FM pela coluna de sílica zirconizada causou uma perda apreciável na eficiência da coluna recheada com suporte de sílica zirconizada. A coluna preparada usando como suporte sílica nua aumentou sua eficiência até valores próximos aos obtidos para sílica zirconizada.



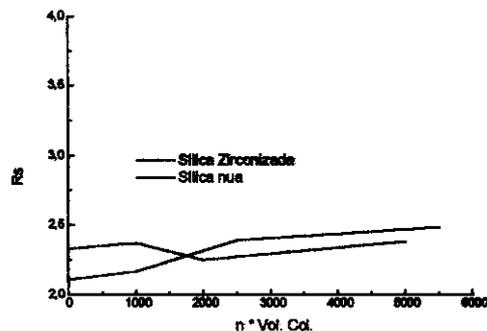


Figura 34 - Lavagem das Colunas com FM MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v). Colunas Analisadas com a Amostra 1.

A eficiência da coluna preparada a partir de sílica zirconizada pode ter sido reduzida devido ao arraste da Fase Estacionária Líquida (FEL) e isto pode ser comprovado pela diminuição nos valores de  $k$  obtidos para o naftaleno e também pela diminuição da resolução entre o par tolueno e naftaleno, mostrando assim uma possível diminuição da qualidade da coluna.

Para fase estacionária preparada a partir de sílica nua a lavagem com a FM MeOH/H<sub>2</sub>O deve ter arrastado alguns oligômeros presentes, de forma que a eficiência da coluna aumentou, a retenção do naftaleno na fase estacionária tornou-se ligeiramente maior e a separação do par tolueno e naftaleno melhorou.

As colunas também foram analisadas pela injeção da amostra 2, cujos resultados podem ser visualizados na Figura 35 onde se pode verificar como variou a eficiência,  $k$ ,  $\alpha$ , assimetria e resolução mudando-se a composição da amostra. Através da análise da Figura 35 verifica-se que a fase estacionária preparada a partir de sílica zirconizada mostrou-se mais estável a análise de compostos básicos que a preparada a partir de sílica.

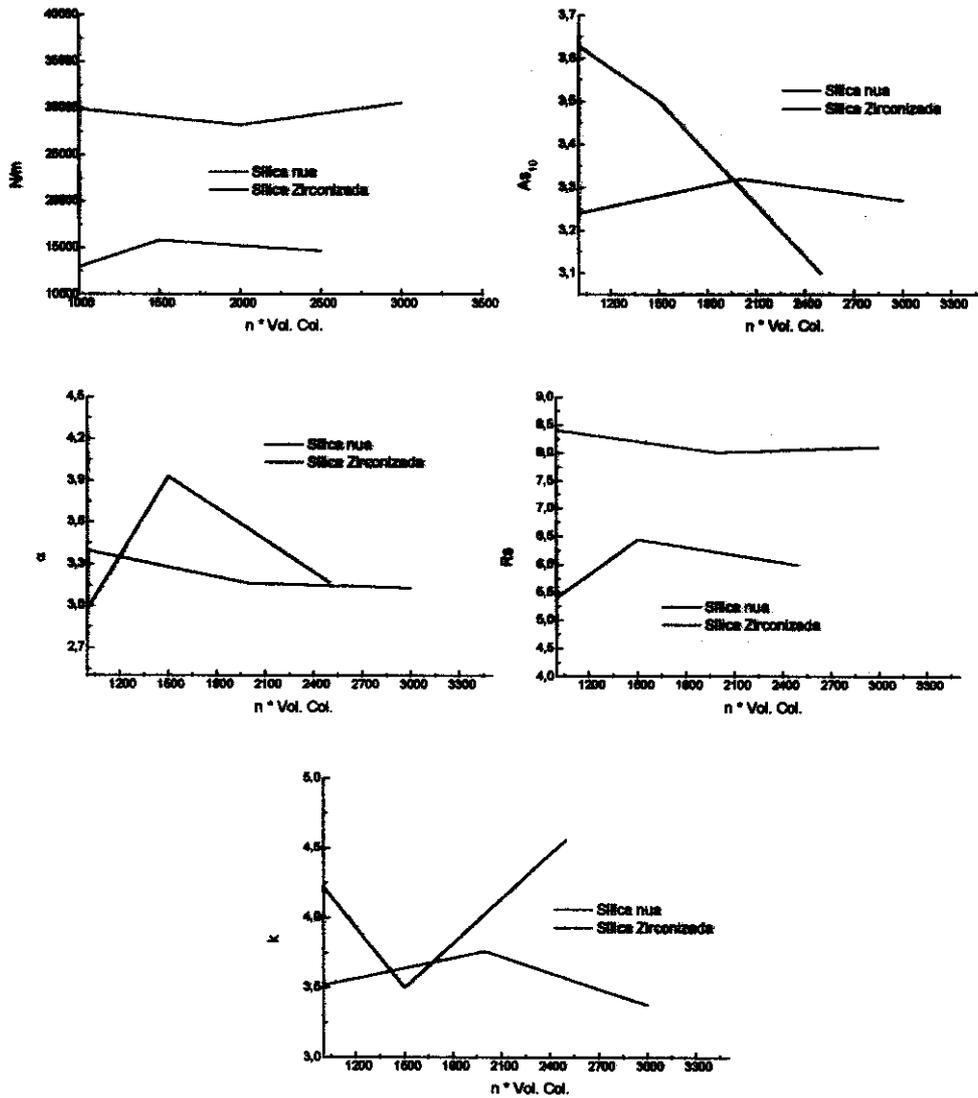


Figura 35 - Lavagem das Colunas com FM MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30 (v/v). Colunas Analisadas com a Amostra 2.

#### IV.c.2.2) Lavagem com Fase Móvel Alcalina

As colunas que foram submetidas à lavagem com fase móvel levemente ácida foram lavadas passando-se por elas fase móvel tamponada MeOH / NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (70/30 v/v) em um volume correspondente a 500 vezes o seu volume interno.

A lavagem com uma solução alcalina não mostrou os resultados esperados, uma vez que as colunas preparadas tanto a partir de suporte de sílica nua como de sílica zirconizada foram totalmente deterioradas após a passagem do tampão, resultado esse constatado pela não separação tanto da amostra 1 como da amostra 2.

## V) Conclusões

Neste trabalho foi feita a síntese e caracterização da sílica gel contendo óxido de zircônio (IV) enxertado. Este material foi usado como suporte na preparação de fases estacionárias sorvidas do tipo reversa e comparado com FE preparadas a partir de suporte de sílica nua.

Os testes de fluorescência de raios-X, XPS e com solução de cromo (VI) confirmaram a presença de zircônia. Observando-se os resultados de XPS e os de fluorescência de raios-X, conclui-se que a zircônia encontra-se na superfície e no interior (dentro dos poros) da sílica (zirconizada), e, sobre a superfície não há zircônio suficiente para que se forme uma camada.

Os testes de análise elementar mostraram que não haviam substâncias orgânicas na sílica e também não haviam substâncias orgânicas residuais após a síntese da sílica zirconizada.

Observou-se, através das análises termogravimétricas, que os suportes de sílica nua e de sílica modificada são termicamente estáveis, bem como as FE preparadas usando esses suportes uma vez que, ocorre perda de 5% de massa do polímero a temperatura de 300 °C, bem superior a temperatura máxima que pode ser usada em CLAE (~ 80 °C). As ATG das FE não mostraram a perda de massa a 100 °C observada nos suportes, tal fato pode ser explicado pelo aquecimento (ativação) a 150 °C, que é submetido o suporte antes da preparação das FE, eliminando toda água eventualmente presente.

Verificou-se que as melhores FE preparadas contém aproximadamente 50% (m/m) de polímero adicionado na preparação. Tal quantidade é necessária porque ocorre uma perda significativa de polímero na etapa de enchimento das colunas devido ao solvente de suspensão usado (CCl<sub>4</sub>), que dissolve o polímero, e também a alta pressão de enchimento. Baseado nas

estimativas de espessura de camada de PMOS, depois do enchimento resta PMOS suficiente para formar somente uma camada muito delgada sobre a superfície. Acredita-se que, na realidade, o polímero não se distribua de maneira uniforme, restando vários pontos na superfície sem polímero. Isto explica, em parte, o mau comportamento cromatográfico da FE em termos de eficiência e assimetria.

As pressões envolvidas nas análises foram relativamente altas, da ordem de 13,8 MPa (2000 psi) para uma vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e as colunas apresentaram um fator de assimetria muito alto, o que pode ser atribuído ao leito cromatográfico não uniforme e ao próprio suporte utilizado, que pelos resultados obtidos, acredita-se não ser uma sílica com qualidades adequadas para preparação de FE, além disso a distribuição não homogênea do PMOS sobre o suporte que deixou os grupos silanóis do suporte expostos.

A eficiência obtida a partir de suporte de sílica zirconizada é relativamente satisfatória (38000 pratos m<sup>-1</sup>) entretanto, por se tratar de partículas de 7 µm se esperaria valores mais elevados. Devido a constantes mudanças nos reservatórios do sistema de enchimento das colunas, não foi possível obter colunas com eficiências maiores. Porém deve-se considerar que suportes regulares normalmente produzem colunas com maiores eficiências que as produzidas com suportes irregulares como os usados neste trabalho.

A zirconização do suporte parece ter tornado a sílica mais imune às interações com compostos básicos, pois verificou-se que a assimetria obtida para o pico do N,N-DMA foi semelhante à do naftaleno. Isto deve-se provavelmente a propriedade que a zircônia possui de ser mais resistente a compostos básicos.

Os testes de estabilidade química mostraram que as colunas sofreram modificações quando expostas a grandes volumes de fase móvel levemente

ácida e que são praticamente destruídas quando se usa uma fase móvel alcalina como o tampão MeOH/NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Talvez o uso de um tampão mais diluído ou a substituição por outro tampão, seja menos agressivo às colunas. Todavia por serem colunas bem mais baratas que as colunas comerciais podem ser usadas por períodos de 30 - 45 dias sem maiores problemas.

Acredita-se que os resultados obtidos, abaixo da expectativa, possam ser atribuídos ao suporte de sílica utilizado, pois apesar do tamanho da partícula ser de 7 µm, a eficiência das colunas cromatográficas recheadas com fases estacionárias preparadas com PMOS sorvido sobre estas sílicas foram inferiores às obtidas com o mesmo polímero sorvido sobre sílica de 10 µm estudadas em outros trabalhos de nosso grupo<sup>[2,34,36,37]</sup>. Portanto é importante que se estude a preparação de fases estacionárias sorvidas utilizando outros suportes de sílica para zirconização.

Embora a eficiência das colunas obtidas com sílica zirconizada não tenha sido muito elevada, a modificação do suporte com metais de transição nos parece ser um método promissor e o grupo vem estudando outros metais, a relação entre a quantidade do metal e de sílica e formas de aumentar a quantidade de polímero após o enchimento usando métodos de imobilização do polímero sobre o suporte. Trabalhos estes que certamente darão continuidade à pesquisa iniciada nessa dissertação.

## VI) Bibliografia

- <sup>1</sup> Collins, C.H.; Braga, G.L. e Bonato, P.S. coordenadores, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da UNICAMP, Campinas, 1990.
  - <sup>2</sup> Anazawa, T.A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, Tipo C8, para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
  - <sup>3</sup> Unger, K.K., "Porous Silica: its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", 3ª edição, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York. 1986.
  - <sup>4</sup> [http://hplc.chem.vt.edu/my\\_home/book/content/gen\\_fram.html](http://hplc.chem.vt.edu/my_home/book/content/gen_fram.html)
- Página Criada e Mantida por: Dr. Yuri Kazakevich e Prof. H.M. McNair.
- <sup>5</sup> Basso, M.A., "Avaliação da Radiação Gama como Agente de Imobilização de Algumas Fases Estacionárias sobre Suportes para uso em Cromatografia Gasosa", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1989.
  - <sup>6</sup> Pesek, J.J. e Tang, V.H., "The Modification of Alumina, Zirconia, Thoria and Titania for Potential Use as a HPLC Stationary Phase Through a Silanization/Hydrolisation Reaction Scheme", *Chromatographia*, 39(1994) 649-654.
  - <sup>7</sup> Nahum, A. e Horváth, C. "Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases. I. Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 53-63.
  - <sup>8</sup> Melander, W.; Stoveken, J. e Horváth, C., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography. I. Comparison of Energetics of Retention on Alkyl-Bonded Phases", *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 35-56.

- 
- <sup>9</sup> Bij, K.E.; Horváth, C.; Melander, W.R. e Nahum, A., "Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases II. Irregular Retention Behavior as Effect of Silanol Masking". *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 65-84.
- <sup>10</sup> Chongying, Li, "Silanol Group Effect in C18 Bonded Phases in HPLC". *Chromatographia*, 34 (1992), 182-184.
- <sup>11</sup> Yu, J. e El Rassi, Z. "Reversed-Phase Liquid Chromatography with Microspherical Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases". *J.Chromatogr.*, 631 (1993) 91-106.
- <sup>12</sup> Hanggi, D.A. e Marks, N.R., "Introduction to Chromatography on Polybutadiene-Coated Zirconia". *LC-GC*, 11, (1993) 128-138.
- <sup>13</sup> Wirth, H.J.; Eriksson, K.O.; Holt, P.; Aguilar, M. e Hearn, M.T.W., "High-Performance Liquid Chromatography of Aminoacids, Peptides and Proteins. CXXIX. Ceramic-Based Particles as Chemically Stable Chromatographic Supports". *J. Chromatogr.*, 646(1993)129-141.
- <sup>14</sup> Silva, R. B. "Aplicação de Metais de Transição na Modificação de Suportes Sólidos Utilizados como Fase Estacionária na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Exame de Qualificação Geral de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
- <sup>15</sup> Peixoto, C.R.M.;"Síntese, Caracterização e Aplicações Analíticas do Óxido de Zircônio (IV) Altamente Disperso sobre a Superfície da Sílica Gel", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1992.
- <sup>16</sup> Chicz, R.M.; Shi, Z. e Regnier, F.G."Preparation and Evaluation of Inorganic Anion-Exchange Sorbents Not Based on Silica". *J. Chromatogr.*, 359(1986) 121-130.
- <sup>17</sup> Kawaraha, M.; Nakamura, H. e Nakajima, T., "Titania and Zirconia: Possible New Ceramic Microparticulates for High-Performance Liquid Chromatography". *J. Chromatogr.*, 515(1990) 149-158

- 
- <sup>18</sup> Tründiger, U.; Müller, G. e Unger, H.H., "Porous Zirconia and Zirconia as Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J.Chromatogr.*, 535(1990)111-125.
- <sup>19</sup> Rigney, M.P.; Funkenbusch, E.F. e Carr, P.W., "Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia", *J. Chromatogr.*, 499(1990) 291-304.
- <sup>20</sup> Rigney, M.P.; Weber, T.P. e Carr, P.W., "Preparation and Evaluation of a Polymer-Coated Zirconia Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, 484(1989) 273-291.
- <sup>21</sup> Yu, J. e El Rassi, Z., "Reversed-Phase Liquid Chromatography of Dansyl Aminoacids with Microspherical Octadecyl-Silica and Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases" , *J. Liq. Chromatogr.*, 16(1993)2931-2959.
- <sup>22</sup> Kurganov, A.; Davankov, V.; Isajeva, T.; Unger, K. e 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.*, 660(1994) 97-111.
- <sup>23</sup> Costa, P.A., "Otimização das Condições de Enchimento de Colunas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1990.
- <sup>24</sup> Borra, C.; Han, M.H. e Novotny, M.J., "Quantitative Analytical Aspects of Reversed-Phase Liquid Chromatography with Slurry- Packed Capillary Columns", *J. Chromatogr.*, 385 (1987), 75-79
- <sup>25</sup> Zimina, T. M.; Smith, R. M.; Myers, P. e King, B.W., "Effects of Kinematic Viscosity of the Slurry on the Packing Efficiency of PEEK Microbore Columns for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 40, (1995) 662-668.
- <sup>26</sup> Zogg, G.C.; Nyiredy, S.Z. e Sticher, O., "Operating Conditions in Preparative Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC). I. Influence of Column

- Preparation and Particle Size of Silica", *J. Liq. Chromatogr.*, 12 (1989), 2031-2048.
- <sup>27</sup> Guan, Y.; Zhou, L. e Shang, Z., "Dry-Packed Capillary Columns for Micro HPLC", *J. High Resol. Chromatogr.*, 15 (1992) 434-436.
- <sup>28</sup> Zuin, C.F. e Collins, K.E., "Preparação e Avaliação de Colunas Recheadas a Seco para CLAE", 15ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 27 a 31 de maio de 1992, Caxambú, MG, resumo IC44.
- <sup>29</sup> Crescentini, G.; Bruner, F.; Mangani, F. e Yafeng, G., "Preparation and Evaluation of Dry-Packed Capillary Columns for High Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1659-1662.
- <sup>30</sup> Zuin, C.F.; Sforça, M.L.; Genovez, M.C.; Vargas, R.M.; Achôa, M.V. e Collins, C.H., "Determinação de Metanol em Bebidas por Cromatografia Gasosa". 14ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 15 a 18 de maio de 1991, Caxambú, MG, resumo QA023.
- <sup>31</sup> Lima, M.A.F., "Desenvolvimento de Colunas para HPLC e Micro HPLC", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1988.
- <sup>32</sup> Dolan, J.W. e Snyder, L.R., "Troubleshooting LC Systems". The Humana Press Inc., Clifton, NJ, 1989.
- <sup>33</sup> Snyder, L.R. e Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley, New York, 1979.
- <sup>34</sup> Anazawa, T.A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1992.
- <sup>35</sup> Braithwaite, A. e Smith, F.J., "Chromatographic Methods", 4<sup>th</sup> Edition, Chapman and Hall, London, 1985.

## Bibliografia

---

- <sup>36</sup> Anazawa, T.A. e Jardim, I.C.S.F., "Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 1265-1279.
- <sup>37</sup> Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E. e Jardim, I.C.S.F., " Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C1 and C8 Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles", *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 159-164.
- <sup>38</sup> Zuin, C.F.; Collins e K.E. "Novos Tipos de Conexões para Colunas de CLAE". V Encontro Interno Estudantil de Pesquisa - UNICAMP, 1987, resumo 61.
- <sup>39</sup> Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Souza, J.B.; Collins, K.E. e Jardim, I.C.S.F., "Polimento da Parede Interna de Aço Inoxidável para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", 14ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 1991, Caxambu, MG, resumo QA010.
- <sup>40</sup> Carraro, F.; Souza, J.B.de; Collins, K.E. e Jardim, I.C.S.F., "Polimento Interno de Colunas de Aço Inoxidável Utilizados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", *Ciênc. Cult., Sup.*, 41(1989)351.
- <sup>41</sup> Gushiken, Y.; Peixoto, C.R.M. e Baccan, N., "Selective Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Chromium (VI) Using a Flow Injection System With a Microcolumn of Zirconium (IV) Oxide Modified Silica Gel", *Analyst*, 117(1992)1029-1032.
- <sup>42</sup> Gushiken, Y., Peixoto, C.R.M. e Kubota, L.T., "Exchange Properties of Titanium (IV) and Zirconium (IV) Oxides Grafted on Silica Gel Surface. Sorption of Chromium (VI) from an Acid Solution", ed. Abe, M., Kataoka, T. and Suzuki, T., Kodansha-Elsevier, Tokyo, 1991, p 607.
- <sup>43</sup> Zuin, C.F. , Pezzin, S.H. e Schnetzler, R.P." Equilíbrio Químico no Ensino Médio Visando Mudança Conceitual"; 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 24 a 27 de maio de 1994, Caxambú, MG, resumo ED058.

- 
- <sup>44</sup> Pires, E.L.; "Estudo do Comportamento Cinético do Sistema Óxi-Redutor Cr(VI)/HClO<sub>4</sub> por Espectrofotometria de Absorção Visível", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1995.
- <sup>45</sup> Ohmacht, R.; Kele, M. e Matus, Z., "Polymer Coated Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **28** (1989) 19-23.
- <sup>46</sup> Hespanhol, M.C., "Estudo da Imobilização, via Radiação Gama, de Fase Estacionária, Polimetiloctadecilsiloxano, sobre suporte de Sílica para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1992.
- <sup>47</sup> Iler, R.K., "The Chemistry of Silica", John Willey, New York, 1979.
- <sup>48</sup> Ender, V., Seibt, K., Zuin, C.F., u.a. "Sorpton von umweltrelevanten Schwermetallen und Bor beim Kontakt waessriger Loesungen mit Aschen und Boeden" . Abschlussbericht zum Fornschungsprojekt FO 917.00. Zittau, Maerz 1996.
- <sup>49</sup> Vichi, F.M.; "Partículas Revestidas com Siliconas: Obtenção, Caracterização e Consolidação"; Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1997
- <sup>50</sup> Goodhew, P.J. e Humphreys, F.J.; "Electron Microscopy and Analysis". 2<sup>nd</sup>. Ed. Taylor & Francis. London. 1988.
- <sup>51</sup> Skoog, D.A.; West, D.M. e Holler, F.J.; "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6<sup>th</sup>. ed. Saunders College Publishing. Fort Worth. 1992.
- <sup>52</sup> Atkins, P.W.; " Physical Chemistry", 4<sup>th</sup>. Ed. Oxford University Press. Oxford, 1990.
- <sup>53</sup> Silva, R. B.; "Preparação de Fases Estacionárias a partir do Polí(metiloctilsiloxano) Sorvido sobre a Sílica Titanizada para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Relatório à FAPESP, Setembro 1996.

- <sup>54</sup> Handbook of Photoelectron Spectroscopy, Perkin Elmer (1982)
- <sup>55</sup> Wood, D.L. e Rabinovich, E.M., "Study of Alkoxide Silica Gels by Infrared Spectroscopy", *Appl. Spectrosc.*, 43 (1989) 263-267.
- <sup>56</sup> Alltech Chromatography, Buyer's Guide, Bulletin 240.
- <sup>57</sup> Cabrera, K.; Arras, R.; Lubda, D.; Krebs, K.F. e Wieland, G., "Preparation and Chromatographic Characterization of a New Stationary Phase for Reversed-Phase HPLC Based on High Purity Silica", *Am. Lab.*, 29 (4), (1997) 44-50.
- <sup>58</sup> Verzele, M., "Trace Metals in Silica Gel Based HPLC Packing Materials", *LC*, 1 (1991) 217-222.