

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

*ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ADSORÇÃO DE ALGUNS
AMINO ÁCIDOS, UTILIZANDO-SE SÍLICA GEL MODIFICADA*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTONIO DE SANTANA SANTOS

Orientador: Prof. Dr Lauro Tatsuo Kubota

Co-orientadora: Profa. Dra. Ileana Facchin

Fevereiro de 1999

UNICAMP



UNIDADE	I 2	
N.º CHAMADA:	UNICAMP	
	Sa59e	
V.	Ex.	
TOMBO BC/	38.900	
PROC.	229/99	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	05/10/99	
N.º CPD		

CM-00126229-5

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

Santos, Antonio de Santana
Sa59e Estudo do comportamento de adsorção de alguns amino ácidos, utilizando-se sílica gel modificada / Antonio de Santana Santos. - - Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Co-orientador: Ileana Facchin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Cromatografia. 2. Afinidade. 3. Biomoléculas. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Facchin, Ileana. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Curriculum Vitae

IDENTIFICAÇÃO:

NOME: Antonio de Santana Santos

DATA DE NASCIMENTO: 30 de Agosto de 1971

NATURALIDADE: Jequié-BA

NACIONALIDADE: Brasileiro

FILIAÇÃO: Arlindo Fernandes dos Santos e Maria de Santana Santos

ESTADO CIVIL: Solteiro

FORMAÇÃO

- Segundo Grau

CAP "Colégio Antonio Pinheiro"

Início: 1988 / Conclusão: 1990

Local: Jequié-BA

- Curso Superior

Bacharel em Química

Universidade Estadual de Campinas-Unicamp

Início: Março de 1993 / Conclusão: Dezembro de 1996

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

- “Estudo das Propriedades de Adsorção de Amino Ácidos Pela Sílica Gel Modificada Com Fosfato de Zircônio”. No XXXVI Congresso Brasileiro de Química da ABQ

Realização: 1-5 de Setembro de 1996. Local: São Paulo.

- “Estudo das Propriedades de Adsorção de Amino ácidos Pela Sílica Gel Modificada com Fosfato de Zircônio “. IV Congresso Interno de Iniciação Científica.

Realização: 28 de outubro a 01 de novembro de 1996. Local: Unicamp.

- “Perfil socio-econômico das família dos alunos de licenciatura em química ingressantes na UNICAMP em 1993”. XVII Encontro de Debates sobre o Ensino de Química (EDEC).

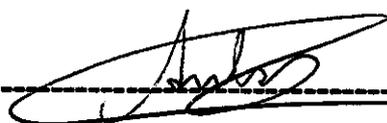
Realização: 23-25 de Outubro de 1997. Local: Ijuí-RS.

- “Estudo da separação de alguns amino ácidos, utilizando-se sílica gel modificada com grupos aminobenzenossulfônico e fosfato”. IX Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA).

Realização: 31 agosto, 01-03 de Setembro de 1997.

Publicação

- "Study of the Adsorption of Some Amino Acids by Silica Chemically Modified with Aminobenzenesulfonic and Phosphate Groups". Lauro T. Kubota, Alessandra Gambero, Antonio Santana Santos, José M. Granjeiro; *J. Colloid Interface Sci.*, 183 (1996) 453-457.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio de Santana Santos', is written over a horizontal dashed line.

Antonio de Santana Santos

Quem nada conhece, nada ama.
Quem nada pode fazer, nada compreende.
Quem nada compreende, nada vale.
Mas quem compreende também ama,
observa, vê... Quanto mais conhecimento
houver inerente numa coisa, tanto maior o amor...
Aquele que imagina que todos os frutos amadurecem
Ao mesmo tempo, como as cerejas, nada sabe
A respeito das uvas.

(Paracelso)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais Arlindo e Maria e minha irmã Conceição, por todo incentivo e participação em minha educação.

**Agradecimento especial ao Lauro, pela
orientação e apoio na realização deste
trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À Ileana minha co-orientadora pela paciência e compreensão.

Ao amigo Renato Rosseto pela disponibilidade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Adélia, Beth, Eric, Júlio, Laércio, Miyuke, Percy, Rosângela e Simone por todo companheirismo.

Aos meus amigos: André, Antenor, Bruno, Diniz, Ione, Mariwalde, Protásio e Renato pelos bons dias de alegria e diversão.

À meus irmãos: Ana, Cesar, João, José, Madalena e Paulo pelo carinho que sempre me deram.

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela utilização de sua infra-estrutura.

À Iara e Paula pela grande prestação de serviço no xerox.

À Bel e André da CPG pela eficiência em suas funções.

A todos da Biblioteca do IQ por estarem sempre disponíveis.

Por tudo que o Colégio Antonio Pinheiro fez por mim.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
I. INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
I.1. Aspectos Gerais da Sílica Gel	3
I.2. Superfície da Sílica Gel	4
I.3. Propriedades da Superfície da Sílica Gel	5
I.3.1. Desidratação-Hidratação da Superfície da Sílica.....	5
I.3.2. Caracterização da Superfície da Sílica.....	7
I.4. Modificação da Superfície da Sílica Gel	7
I.4.1. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Grupos Inorgânicos (Óxidos Metálicos).....	8
I.4.2. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Grupos Organofuncionais.....	9
I.5. Caracterização da Sílica Gel Funcionalizada	12
I.5.1. Métodos para a Caracterização de Grupos Funcionais e Variação Estrutural em Sílica Gel Modificada.....	13
I.6. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Gel, Normal e Funcionalizada	15
I.6.1. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Gel.....	15
I.6.2. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Funcionalizada..	17

I.7. Uso da Sílica Funcionalizada em Métodos Cromatográficos	19
I.7.1. Cromatografia Envolvendo Amino Ácidos e Proteínas.	19
I.7.2. Algumas Considerações sobre a Cromatografia de Afinidade.....	21
I.8. Considerações sobre a Escolha dos Amino Ácidos.....	22
I.8.1. Propriedades Ácido-Base dos Amino Ácidos.....	25
II. OBJETIVOS.....	27
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
III.1. Reagentes Utilizados.....	28
III.2. Equipamentos.....	29
III.3. Preparação das Matrizes de Adsorção.....	30
III.3.1. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Zircônio Hidratado.....	30
III.3.2. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Fosfato de Zircônio.....	30
III.3.3. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Níobio (V).....	31
III.3.4. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Grupos Aminopropil-Benzenossulfonato.....	31

III.4. Caracterização das Sílicas Modificadas.....	32
III.4.1. Caracterização das Sílica Modificadas com Óxido de Zircônio, Fosfato de Zircônio e Óxido de Nióbio.....	32
III.4.2. Caracterização da Sílica com Grupo Organofuncional	34
III.4.2.1. Determinação de Nitrogênio.....	34
III.4.2.2. Espectros Vibracionais.....	34
III.5. Otimização das Condições de Análise dos Amino Ácidos..	35
III.6. Cinética de Adsorção dos Amino Ácidos.....	35
III.7. Obtenção das Isotermas de Adsorção dos Amino Ácidos..	36
III.8. Determinação da Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos.....	36
III.9. Estudo da Eluição de Misturas Binárias de Amino Ácidos em Coluna.....	37
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
IV.1. Caracterização da Sílica Gel Modificada com Grupos Aminopropil-Benzenossulfonato (SABS).....	38
IV.2. Caracterização da Sílica Gel Modificada com Óxido de Zircônio e com Fosfato de Zircônio (SZP).....	40

IV.3. Caracterização da Sílica Gel Modificada com Óxido de Nióbio (SN).....	41
IV.4. Cinética de Adsorção dos Amino Ácidos.....	43
IV.5. Análise do Comportamento de Adsorção em Função da Concentração.....	44
IV.5.1. Adsorção pela Sílica SABS.....	45
IV.5.2. Adsorção pela Sílica SN.....	47
IV.5.3. Adsorção pela Sílica SZ.....	48
IV.5.4. Adsorção pela Sílica SZP.....	51
IV.5.5. Adsorção pela Sílica Gel.....	51
IV.6. Análise Comparativa das Adsorções da Superfície das Sílicas Modificadas.....	55
IV.6.1. Correlação das Adsorções com a Acidez dos Materiais.....	56
IV.7. Comportamento de Adsorção das Sílicas Modificadas em Função do pH.....	57
IV.7.1. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SABS.....	58
IV.7.2. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SN.....	61
IV.7.3. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos	

pela Sílica SZ.....	63
IV.7.4. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SZP.....	65
IV.7.5. Análise Comparativa das Sílicas Modificadas.....	67
IV.8. Experimento em Coluna para Verificar o Comportamento de Adsorção de Misturas Binárias dos Amino Ácidos.....	69
IV.8.1. Resultados para a Sílica SABS.....	69
IV.8.2. Resultados para a Sílica SZP.....	72
IV.8.3. Análise Comparativa da adsorção em Coluna.....	74
V. CONCLUSÕES.....	75
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Representação dos grupos silanóis da superfície da sílica.....	4
Figura 2. Formação dos grupos siloxanos nos macroporos da sílica (A) e nos microporos da sílica (B).....	16
Figura 3. Isoterma de adsorção típica.....	18
Figura 4. Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade.....	22
Figura 5. Fórmula estrutural geral dos amino ácidos.....	23
Figura 6. Glicina (a); leucina (b); lisina (c) e histidina (d).....	24
Figura 7. Espectro na região de infravermelho da sílica SABS.....	39
Figura 8. Curvas de adsorção da glicina em função do tempo para as diferentes sílicas: SABS (a); SZP (b); SZ (c); SN (d) e sílica gel (e).....	44
Figura 9. Isotermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SABS em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	46
Figura 10. Isotermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SN em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	49
Figura 11. Isotermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SZ em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	50

Figura 12. Isotermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SZP em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	52
Figura 13. Isotermas de adsorção de amino ácidos pela sílica gel em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	55
Figura 14. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SABS. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	60
Figura 15. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SN. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	62
Figura 16. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SZ. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).....	64
Figura 17. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se sílica SZP. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d)	66
Figura 18. Adsorção comparativa (mmol g^{-1}) referente à percolação da mistura de glicina/leucina (gráfico A); glicina/lisina (gráfico B) e glicina/histidina (gráfico C). Experimento em coluna para a sílica SABS.	71

Figura 19. Adsorção comparativa (mmol g^{-1}) referente à percolação da mistura de glicina/leucina (gráfico A), glicina/lisina (gráfico B) e glicina/histidina (gráfico C). Experimento em coluna para a sílica SZP

..... 73

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Valores de pK e pI dos amino ácidos utilizados.....	25
Tabela 2. Dados dos padrões para quantificação de Zircônio e Fosfato....	33
Tabela 3. Parâmetros otimizados de irradiação para a determinação de Zr, P, Nb.....	33
Tabela 4. Resultados da quantificação dos grupos imobilizados na superfície da sílica gel (mmol g^{-1}) e da determinação da área superficial pelo método BET ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).....	43
Tabela 5. Capacidades máximas de adsorção de cada sílica modificada em (mmol g^{-1}).....	55
Tabela 6. Relação entre a retenção de um composto com o pH da solução.....	57
Tabela 7. Valores de adsorção máxima dos amino ácidos para cada sílica modificada (N_f em mmol g^{-1}), com o respectivo valor de pH da adsorção máxima.....	68
Tabela 8. Valores referentes ao fator de separação entre as misturas binária de amino ácidos. Experimento em coluna para a sílica SABS e análise por HPLC.....	70
Tabela 9. Valores referentes ao fator de separação entre as misturas binária de amino ácidos. Experimento em coluna para a sílica SZP e análise por HPLC.....	72

Título: Estudo do Comportamento de Adsorção de Alguns Amino Ácidos, Utilizando-se Sílica Gel Modificada.

Autor: Antonio de Santana Santos

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsua Kubota

Co-orientadora: Profa. Dra. Ileana Facchin

RESUMO

A possibilidade da imobilização de grupos funcionais na superfície da sílica gel, associado às suas características favoráveis ao processo de adsorção, com possíveis aplicações em métodos de purificação e separação, despertou o interesse no estudo do comportamento de adsorção de biomoléculas, tais como: amino ácidos.

Com esta finalidade fez-se a modificação da sílica gel com quatro diferentes grupos: aminopropil-benzenossulfonato (SABS), óxido de nióbio (SN), óxido de zircônio (SZ) e fosfato de zircônio (SZP), obtendo uma quantidade de 0,65; 0,80; 0,57 e 0,45 mmol g⁻¹ de grupos imobilizados na superfície, respectivamente, com áreas superficiais de: 378, 486, 471, 513 m² g⁻¹, na mesma ordem. Posteriormente foram realizados experimentos em batelada para verificar o comportamento de adsorção de alguns amino ácidos pelas sílicas modificadas, bem como, a influência do pH na adsorção dessas moléculas.

Para o experimento em batelada, dissolveram-se os amino ácidos em água, obtendo-se as melhores adsorções com a glicina. Estes resultados foram: 1,39 mmol g⁻¹ para a SABS, 0,76 mmol g⁻¹ para a SZP, 0,49 mmol g⁻¹ para SZ e 0,45 mmol g⁻¹ para a SN. Usando outros amino ácidos obteve-se bons resultados como: 0,82 mmol g⁻¹ de histidina e 0,65 mmol g⁻¹ de lisina, usando

sílica SABS; $0,75 \text{ mmol g}^{-1}$ de leucina e $0,59 \text{ mmol g}^{-1}$ de lisina, usando SZP. Neste experimento foi possível notar que todas as sílicas modificadas obtiveram resultados de adsorções superiores a sílica gel pura, para a qual a adsorção máxima foi de $0,34 \text{ mmol g}^{-1}$, para a glicina.

Com o controle do pH (variando de 2 a 6) houve mudança significativa na resposta das adsorções dos amino ácidos, apresentando, em muitos casos, máximos de adsorção bem definidos, como para a glicina em pH 3,0; leucina em pH 4,0 e histidina em pH 2,0, usando-se a sílica SABS ou ainda a lisina em pH 1,0 e leucina em pH 4,5, usando-se a sílica SZP, evidenciando uma maior seletividade, sem perda na capacidade de adsorção. Neste caso, a SABS e a SZP foram as sílicas que apresentaram melhores resultados, mostrando que através do controle do pH é possível melhorar a seletividade, possibilitando a separação de amino ácidos.

Title: Study of the Behavior of Adsorption of some Acid Amino, Using Modified Silica Gel.

Author: Antonio de Santana Santos

Supervisor: Lauro Tatsuo Kubota

Co-supervisor: Ileana Facchin

ABSTRACT

The possibility of functional groups immobilization on the silica gel surface associated to its characteristics favorable to the adsorption process with possible applications in purification and separation methods, brought up the interest to study the behavior of biomolecules adsorption, such as, amino acids

Modification of the silica gel was accomplished with four different groups: aminopropyl-benzenesulfonate (SABS), niobium oxide (SN), zirconium oxide (SZ) and zirconium phosphate (SZP), presenting respectively 0.65, 0.80, 0.57 and 0.45 mmol g⁻¹ of immobilized groups on the surface. The new surface area were 378, 486, 471, 513 m² g⁻¹ respectively. batch experiments were carried out in order to verify the adsorption behavior of some amino acids by the modified silicas, as well as the influence of the solution pH on the adsorption of these molecules

For the batch experiment, when the amino acid was dissolved in water, the best adsorption results obtained to glycine were: 1.39 mmol g⁻¹ for SABS, 0.76 mmol g⁻¹ for SZP, 0.49 mmol g⁻¹ for SZ and 0.45 mmol g⁻¹ for SN. Employing other amino acids, good results were also obtained such as: 0.82

mmol g⁻¹ of histidine and 0.65 mmol g⁻¹ of lysine, using SABS silica; 0.75 mmol g⁻¹ of leucine and 0.59 mmol g⁻¹ of lysine, using SZP. In this experiment it was possible to note that all modified silicas showed results higher than the pure silica gel, which showed maximum adsorption of 0.34 mmol g⁻¹ when for glycine.

By controlling of the solution pH (in the range 2 - 6), a noticeable change in the amino acids adsorption capacity was observed, often presenting well defined maxima adsorption, as for glycine at pH 3.0, leucine at pH 4.0 and histidine at pH 2.0, using SABS, or even lysine at pH 1.0 and leucine at pH 4.5, using SZP, highlighting a higher selectivity, with no loss of adsorption capacity. Thus, SABS and SZP showed the best results, indicating that by a thorough pH control of the solution may improve its selective character, allowing a separation process.

I. INTRODUÇÃO

O advento da biologia molecular tem exigido um contínuo desenvolvimento das técnicas de purificação e separação de biomoléculas¹. Em geral, os vários processos existentes são trabalhosos e demorados².

Neste sentido é possível notar grandes esforços no desenvolvimento de métodos cromatográficos nos últimos anos, tais como: a cromatografia de troca-iônica^{3,4} e a cromatografia de afinidade^{5,6}. Estes métodos baseiam-se na exploração das propriedades físico-químicas das fases estacionárias, as quais desenvolvem diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador suportado e os íons da fase móvel, bem como na exploração das propriedades biológicas de algumas moléculas em unirem-se reversivelmente a ligantes específicos⁷, respectivamente.

Uma vez conhecida a importância destes trocadores e dos grupos funcionais suportados na fase estacionária, várias tentativas de desenvolver trocadores sintéticos têm sido realizadas visando ao aumento da capacidade de troca, da velocidade e da eficiência durante a separação, principalmente, nos métodos cromatográficos.

Trocadores sintéticos podem ser preparados a partir de óxidos de metais do grupo IV e V, como o zircônio⁸ e o nióbio^{9,10} e de ácidos de metais do mesmo grupo como, por exemplo, o ácido fosfórico¹¹. Estes materiais apresentam a vantagem de serem estáveis a tratamentos térmicos e à radiação nuclear.

O avanço ocorrido nos estudos efetuados com estes trocadores sintéticos¹² é importante para o entendimento dos processos de separação de moléculas e íons. No entanto, os dados disponíveis na literatura não são

suficientes para explicar os mecanismos de adsorção envolvidos entre os solutos e as matrizes. Em sua grande maioria, estes estudos restringem-se a fases estacionárias orgânicas^{13,14}, capazes de promover adsorção de moléculas e íons metálicos em solventes aquosos¹⁵ e não aquosos¹⁶⁻¹⁸. Tem-se observado, entretanto, o uso de fases estacionárias inorgânicas, como a sílica, os óxidos metálicos¹⁹, as zeólitas²⁰ e as argilas²¹. Estas fases começam a despertar bastante interesse devido às vantagens sobre as fases orgânicas, tais como: estabilidade, adsorção de cátions e ânions através do controle do pH da solução²², grande área superficial, rigidez²³⁻²⁵ e alta seletividade²⁶. Tais características tornam as fases inorgânicas capazes de promover a separação de vários tipos de moléculas e íons²⁷.

Com relação à sílica, ela apresenta algumas vantagens sobre outros adsorventes inorgânicos, tais como: grau de pureza; poros homogêneos, área superficial elevada, pequena pressão de inchamento^{28,29}, além da possibilidade de modificação da sua estrutura, com uma grande variedade de grupos funcionais.

Com todas estas características favoráveis ao processo de troca iônica e adsorção apresentada pela sílica gel, sobretudo após a modificação de sua superfície, e sabendo-se que algumas proteínas apresentam afinidade com grupos fosfato e sulfônico³⁰, seria importante investigar possíveis interações de algumas moléculas (amino ácidos) com esses grupos presentes na sílica modificada. Estes estudos permitiriam avançar com relação ao entendimento dos processos característicos de adsorção entre a fase estacionária e a molécula, levando a um domínio da técnica de separação de moléculas, tais como, amino ácidos e proteínas.³¹

I.1. Aspectos Gerais da Sílica Gel

A sílica ou dióxido de silício pode ser natural ou sintética, não-cristalina ou cristalina. Na preparação da sílica e na estrutura do silicato está o SiO_4 , que corresponde a um tetraedro regular, no qual, os quatro íons de oxigênio (O^{2-}) situam-se nos vértices e o átomo de silício no centro da cavidade. Isto se deve ao fato que, sendo o íon O^{2-} muito maior que o íon silício (Si^{+4}), a presença de quatro unidades na molécula de SiO_4 faz com que haja um contato mútuo entre eles e, portanto, o íon silício é dito que está num buraco tetraédrico³².

Um bom entendimento da estrutura da sílica cristalina é útil na compreensão da estrutura da superfície da sílica não-cristalina, bem como seu interior. Todas as formas da sílica contêm Si-O ligados com comprimento ao redor de 0,162 nm, que é consideravelmente menor que a soma dos raios covalentes dos átomos de silício e oxigênio (0,191 nm)³³. O encurtamento do comprimento da ligação ocorre devido ao caráter parcialmente iônico da ligação e é responsável pela relativa estabilidade das ligações siloxanas.

Na sílica não-cristalina a estrutura interna é determinada, ao oposto da sílica cristalina, por um empacotamento aleatório de unidades $[\text{SiO}_4]^{4-}$, que resulta na estrutura não periódica. Como resultado da diferença das várias estruturas da sílica amorfa, ela apresenta diferentes densidades.

O comprimento e o ângulo da ligação Si-O, tanto na sílica amorfa quanto na cristalina, têm sido estudados por espalhamento de raios-X³⁴, ^{29}Si RMN^{35,36}, difração de nêutrons e elétrons e por espectroscopia na região de infravermelho³⁷. Três bandas de absorção fortes a 800, 1100 e 1250 cm^{-1} , medidas pela técnica de absorção no infravermelho de transmissão, são

atribuídas à vibração fundamental Si-O e não diferem grandemente nas diferentes sílicas quanto à posição.

I.2. Superfície da Sílica Gel

Várias técnicas analíticas permitiram confirmar e expandir a visão da superfície da sílica em termos dos grupos silanóis, pontes de siloxanos e água adsorvida por pontes de hidrogênio. É aceito que os átomos de silício da superfície tendem a ter uma configuração tetraédrica completa e que em meio aquoso sua valência livre torna-se saturada com grupos hidroxilas, formando grupos silanóis. Grupos silanóis vizinais podem condensar para formar, sob condições apropriadas, pontes de siloxanos: $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$.

Os possíveis tipos de grupos silanóis e siloxanos presentes na superfície da sílica encontram-se representados na Figura 1³³.

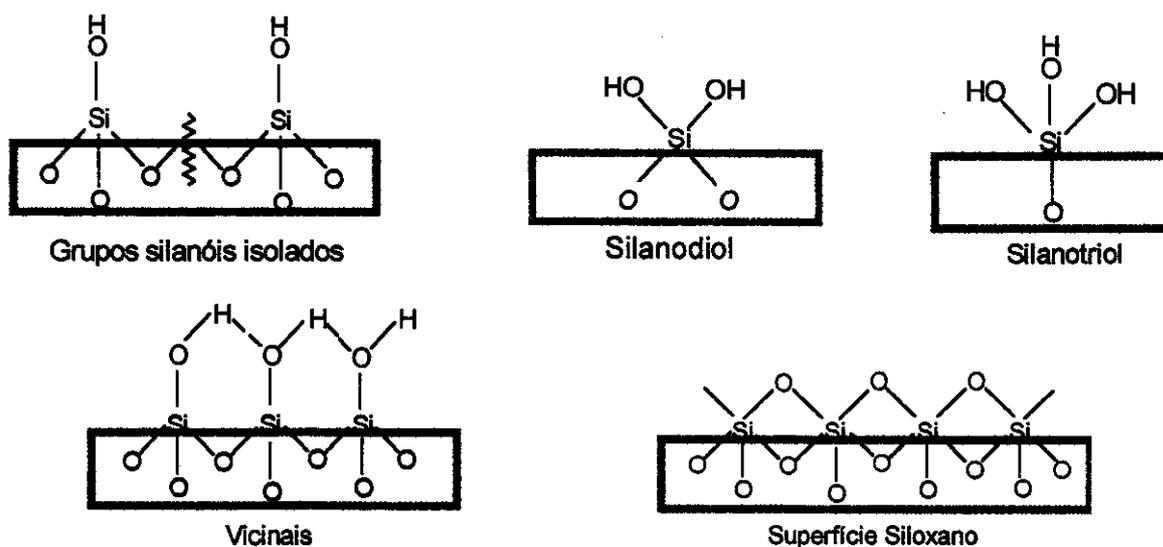


Figura 1. Representação dos grupos silanóis da superfície da sílica.

É importante salientar que os grupos silanóis são formados na superfície da sílica no momento da síntese, isto é, durante a condensação polimérica do Si(OH)_4 ou como resultado da rehidroxilação da sílica termicamente desidratada, quando tratada com água ou em solução aquosa. Os grupos silanóis na superfície da sílica podem ser classificados de acordo com sua natureza, multiplicidade de sítios e tipo de associação³⁸.

I.3. Propriedades da Superfície da Sílica

I.3.1. Desidratação-Hidratação da Superfície da Sílica

Quando a sílica é aquecida, os grupos hidroxilas são liberados perdendo-se água. Contudo, alguns grupos persistem mesmo à temperatura de 800°C, sendo que a remoção completa requer aquecimento acima de 1000°C por um tempo prolongado. Na verdade, o aquecimento da sílica em atmosfera anidra ou em vácuo elimina parcialmente os grupos hidroxilas do material. Quando a desidroxilação é realizada a temperaturas acima de 600°C, somente permanecem hidroxilas residuais na superfície, as quais são relativamente imóveis. A concentração de grupos hidroxilas na superfície da sílica seca a 115°C é de aproximadamente $6,25 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$. Para a desidroxilação da sílica a 600°C o número é de aproximadamente $3,1 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$, que se reduz novamente para $1,4 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$ para a sílica aquecida a 800°C. Quando a sílica é novamente hidratada, a concentração de grupos hidroxilas na superfície é de 4,3 a $5,5 \times 10^{-2} \text{ \AA}^2$, mais baixo que o valor para a sílica antes do tratamento térmico³⁹.

As propriedades de adsorção de materiais contendo sílica dependem muito da estrutura química desses grupos hidroxilas terminais. O grande conhecimento destes grupos hidroxilas, é na verdade, pré-requisito para novas discussões.

Depois de removidas as moléculas de água na superfície, à temperatura menor que 160°C, diz-se que a superfície foi ativada, ou seja, as moléculas de água fisicamente adsorvidas foram removidas, sem danificação da estrutura do material. A vagarosa perda de peso pode ser atribuída aos grupos hidroxila (banda em 3660 cm^{-1}), os quais apresentam hidrogênios vizinhos e são removidos como água durante a desidratação térmica. Até aproximadamente 900°C, pode ser observado um grupo OH por nm^2 na superfície, correspondendo à banda bem definida a 3747 cm^{-1} atribuída a vibrações livres dos grupos hidroxilas da superfície da sílica, que não são perturbados por este desenvolvimento. É importante notar que acima da temperatura de 450°C, a desidratação da superfície torna-se progressivamente irreversível. Em aquecimentos acima de 800°C, ponto em que o espectro na região de infravermelho mostra somente as vibrações livres no grupo silanol na superfície, a desidratação é irreversível.

A adsorvitividade e reatividade destes grupos é, na verdade, dependente da sua ocorrência como espécies isoladas ou ligadas por pontes de hidrogênio. Analitos bases de Lewis adsorvem, preferencialmente, nos grupos hidroxilas de vibração livre, enquanto que espécies não doadoras de pares eletrônicos adsorvem, melhor, em grupos silanóis ligados por pontes de hidrogênios⁴⁰.

I.3.2. Caracterização da Superfície da Sílica

As principais propriedades superficiais da sílica gel, associadas aos fenômenos de adsorção, são: área superficial específica, tamanho das partículas e diâmetro médio dos poros.

A área superficial específica dá uma idéia da extensão da superfície do material disponível às interações físicas e químicas e é, normalmente, expressa em $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. A determinação da área é realizada, principalmente, através de adsorções de gases ou soluções⁴¹, sendo o método de Brunauer Emmett e Teller⁴², conhecido como método BET, um dos mais utilizados.

O volume específico de poros (V_p) refere-se ao volume dos poros presentes em cada grama do material ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$), podendo ser determinado por diversos métodos, como pelo emprego de um líquido inerte, ou com o método mercúrio-hélio⁴³, ou ainda por condensação de nitrogênio à temperatura do nitrogênio líquido⁴⁴.

Para a determinação do diâmetro médio de poros, o método mais empregado é o da condensação capilar, conhecido como porosimetria, no qual é feita a medida do volume de um líquido (mercúrio), que não molhe o adsorvente, quando forçado sob pressão dentro dos capilares⁴⁵.

I.4. Modificação da Superfície da Sílica Gel

A imobilização dos reagentes sobre a superfície da sílica oferece algumas vantagens em relação à imobilização sobre outros suportes, tais como, polímeros orgânicos. Isto porque a sílica é prontamente modificada por uma variedade de agentes silicosos, alcóxidos e haletos, aminas primárias e

secundárias e outros reagentes variados, permitindo imobilização de grandes quantidades de grupos funcionais. Outro aspecto importante é que, na sílica, os grupos estão ligados na superfície deste suporte, proporcionando altas velocidades de troca^{46,47}, enquanto que algumas matrizes poliméricas orgânicas, com ligações altamente cruzadas, requerem maior tempo para atingirem o equilíbrio⁴⁸. Outra vantagem é que a sílica oferece excelente resistência à dilatação, sendo que mudanças na composição do solvente têm pequeno efeito sobre esse suporte em $\text{pH} < 9,0$ ⁴⁹. Assim, superfícies de sílica são excelentes para a imobilização de reagentes analíticos.

1.4.1. Modificação da Superfície da Sílica com Grupos Inorgânicos (Óxidos Metálicos)

Usualmente, o método mais eficaz para obtenção de óxidos metálicos suportados na sílica é o enxerto, que leva à formação de ligação covalente entre o suporte e a espécie imobilizada. Neste método, o sólido é obtido através de reação, em fase líquida, do suporte com o íon metálico, na forma de haleto ou alcóxido. Os óxidos obtidos deste modo encontram-se altamente dispersos, mantendo as propriedades morfológicas iniciais do suporte, como granulometria, área superficial e porosidade^{50,51}.

Há duas maneiras principais de se conseguir esse enxerto:

a) Interação direta do haleto ou alcóxido com grupos hidroxilas da superfície, como mostra a equação (1), onde $\equiv\text{Si-OH}$ representa os grupos silanóis da superfície da sílica, M é o metal ligante e X o haleto utilizado.



b) Interação com grupos formados na superfície do óxido depois da ativação química, que consiste na troca dos átomos de hidrogênio por íons de metal alcalino (K). Esta ativação leva a um aumento da capacidade nucleofílica dos átomos de oxigênio presentes, originalmente, nos grupos hidroxilas da superfície, equação (2).



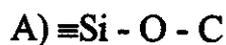
Após esta primeira etapa é feita a hidrólise do haleto ou alcóxido imobilizado para obtenção do óxido hidratado, como representado na equação (3).



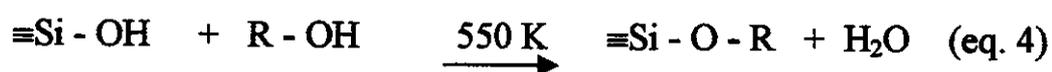
1.4.2. Modificação da Superfície da Sílica com Grupos Organofuncionais

As hidroxilas da superfície da sílica gel reagem facilmente com grupos organossilanos para produzir a sílica quimicamente modificada, cujas propriedades químicas e físicas são substancialmente diferentes da sílica original. Sílica modificada por fase ligada, com grupos alquila e arila tem maior importância técnica e comercial como fase estacionária para cromatografia líquida,⁵² visto que a superfície hidrofílica é levada à hidrofóbica, variando suas características de adsorção⁵³.

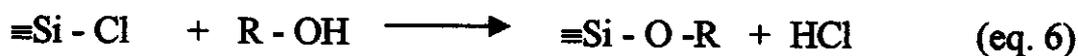
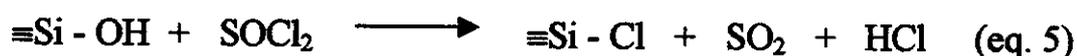
Para a modificação da sílica com grupos organofuncionais há três principais tipos de ligação entre a superfície e as moléculas orgânicas:

A) Ligações do tipo $\equiv\text{Si} - \text{O} - \text{C}$

Os grupos silanóis de caráter fracamente ácido na superfície da sílica gel, podem reagir diretamente com os álcoois a temperaturas elevadas:



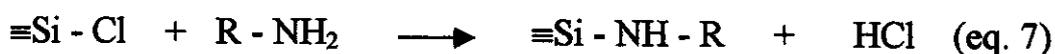
É possível obter o derivado alcóxido reagindo, primeiramente, os silanóis da superfície da sílica com cloreto de tionila e, numa segunda etapa, proceder a reação com álcool, como mostram as equações (5) e (6).



É importante notar que, uma vez clorada a superfície da sílica, abrem-se caminhos para outras reações, devido à alta reatividade da ligação Si - Cl, assim como ocorre com os clorosilanos em geral.

B) Ligação do tipo $\equiv\text{Si} - \text{NH} - \text{C}$

Estas ligações podem ser obtidas reagindo-se a sílica clorada, produto da equação (5), com aminas primárias ou secundárias, obtendo-se compostos que são resistentes à hidrólise no intervalo de pH entre 4 e 8, conforme indicado nas equações (7) e (8), onde R = -COOH, NH_2 , grupos aromáticos e outros.

C) Ligação do tipo $\equiv\text{Si} - \text{C}$

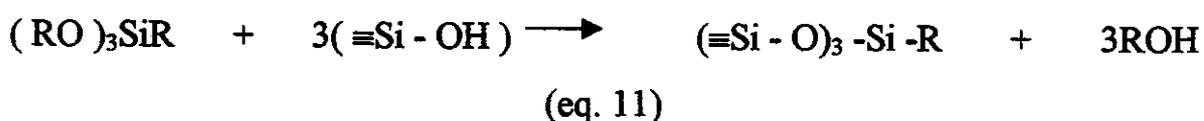
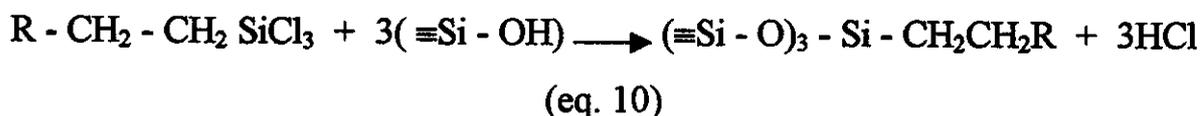
Este tipo de ligação é o preferido para fixar grupos ligantes à superfície da sílica, visto que é realizada sob condições brandas, resultando numa fase estacionária mais estável e hidrolítica do que as citadas anteriormente.

Em geral, é utilizado o reagente de Grignard, numa segunda etapa, para a formação das ligações $\equiv\text{Si} - \text{C}$, como visto na equação (9), partindo-se de sílicas cloradas, representada na equação (5), onde R representa um radical orgânico e X, o Cl, Br ou I.



Outro método importante para este tipo de ligação é a reação dos grupos silanóis da superfície com organoclorossilano ou organoalcóxissilano, equações

(10) e (11), onde RO representa $-\text{OCH}_3$ ou $-\text{OC}_2\text{H}_5$ e R os grupos organofuncionais.



I.5. Caracterização de Sílica Gel Funcionalizada

A demanda por novos materiais exigidos pelas novas tecnologias, na década de oitenta, levou à procura de um maior esclarecimento sobre a superfície da sílica. Avanços significativos na instrumentação e desenvolvimento de novas técnicas de análise de superfície estão permitindo significativos progressos na elucidação da estrutura da sílica gel. Há vários métodos para caracterizar a sílica funcionalizada. A análise elementar de C, H, e N, por meio do método de *Kjeldhal*, na maioria das vezes, é suficiente para avaliar a quantidade de grupos pendentes por unidade de massa do material⁵⁴. Há casos, no entanto, onde o grupo organofuncional não tem nitrogênio e, por isso, a análise elementar não é suficiente para determinar a quantidade desses grupos, devido à possibilidade de existir alcóxidos não reagidos, além de outros subprodutos⁵⁵, sendo necessário recorrer a outros métodos. Abaixo é feita uma descrição resumida de alguns dos principais métodos de caracterização de sílica gel.

I.5.1. Métodos para a Caracterização de Grupos Funcionais e Variação Estrutural em Sílica Modificada

Os trabalhos realizados antes dos anos oitenta, para a determinação da área superficial, eram baseados na capacidade de adsorver moléculas de área seccional conhecida, em monocamadas, como visto no item (I.3.2). Por exemplo, no método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), a área superficial específica é determinada pela adsorção de nitrogênio molecular, que possui uma área seccional de $16,2 \text{ \AA}^2$.

Para materiais porosos, a capacidade da superfície em adsorver água seria uma definição mais exata da área da superfície da sílica. Vários trabalhos na literatura⁵⁶ mostraram o comportamento de adsorção da água nos poros de silicatos através de isotermas de adsorção. Outro método para medida da área da superfície usando água é baseado na ressonância magnética nuclear, discutida por Gallegos e colaboradores⁵⁷. No entanto, o método mais moderno para a determinação da área de superfícies irregulares é baseado na geometria fractal^{58,59}.

Além da determinação da área, várias outras técnicas são utilizadas para caracterizar a sílica, uma delas, bastante empregada, é o Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS). Por meio desta técnica é possível determinar o volume dos poros, bem como o tamanho dos mesmos³⁴.

Outra técnica usual é a Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios-X (XPS), também conhecida por Espectroscopia de Elétrons para Análise Química (ESCA). Ela tem aplicações qualitativas e/ou quantitativas, já que neste último a área do pico no espectro de XPS é considerada diretamente proporcional ao número de átomos do elemento do qual o pico deriva. Desta forma, pode-se

obter a porcentagem atômica relativa de cada elemento químico presente na amostra^{60,61}.

Assim como na análise de sólidos no qual se busque determinações quantitativas de metais suportados na superfície deste sólido, uma técnica bastante elegante é a Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva (EDXRF)^{62,63}. Ela permite a identificação dos elementos presentes na amostra a partir do comprimento de onda da radiação emitida característica, e sua determinação quantitativa a partir da intensidade de radiação emitida, quando a amostra é bombardeada por outra radiação similar.

Já na caracterização das propriedades do sólido ao nível das dimensões atômicos, uma técnica utilizada é a Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Em geral, a maior quantidade de informações concernentes aos sítios paramagnéticos em sólidos pode ser obtida a partir de medidas em monocristais. No entanto, alguns materiais que não formam cristais simples ou únicos, como vidros, cerâmicas e sílicas podem também ser analisados^{64,65}.

Já no estudo de grupos funcionais suportados na superfície da sílica, uma técnica muito empregada é a Espectroscopia de absorção no Infravermelho. Nestes espectros, as absorções mais significativas ocorrem entre 2000 e 1870 cm^{-1} , devido à combinação do esqueleto da sílica e em 1630 cm^{-1} , que correspondem a vibrações de deformação angular da molécula de água. Por sua vez, na região entre 3800-2800 cm^{-1} ocorrem bandas muito intensas e largas, devido às vibrações de estiramento simétrico, do grupo hidroxila da água e do grupo silanol. Portanto, os intervalos disponíveis para a caracterização do material funcionalizado^{66,67} estão nas faixas compreendidas entre 2800-2000 e 1750-1350 cm^{-1} .

Uma outra técnica utilizada para o estudo dos grupos hidroxilas na superfície da sílica gel é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN)⁶⁸, que permite verificar a quantidade dos grupos hidroxilas isolados e dos geminais. Por sua vez, para o estudo dos grupos silanóis residuais na superfície da sílica modificada, uma técnica eficiente é a Polarização Cruzada com Rotação em Ângulo Mágico^{69,70} (CP-MAS), que é empregada para se obter os espectros de RMN de ²⁹Si de sólidos. A técnica é muito útil no estudo de superfície de sílica, pois envolve apenas os núcleos de silício próximos à superfície, onde os prótons são mais abundantes⁷¹.

I.6. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Gel, Normal e Funcionalizada

I.6.1. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Gel

A sílica gel tem uma superfície altamente reativa com uma distribuição casual dos grupos silanóis. O mecanismo de adsorção compreende, na verdade, as interações dos grupos silanóis da superfície com qualquer função polar que possa estar presente no soluto, tais como: álcoois, aminas, cetonas, ácidos carboxílicos, etc.

Para o emprego da sílica nos processos de adsorção, é necessária a ativação da mesma, o que envolve a sua desidratação, conforme mencionado no item I.3.1. Associada aos grupos silanóis está a água de hidratação, que pode ser classificada como segue:

- 1- Ligada fracamente, facilmente removida por aquecimento ou por extração com solvente.
- 2- Fortemente ligada.

3- Água presente como OH dos SiOH vicinais, que pode ser removida por forte aquecimento.

Somente nos dois primeiros casos a remoção de água é reversível.

A superfície dos poros estreitos da sílica é coberta, principalmente, por grupos hidroxilas em pontes de hidrogênio, enquanto a superfície dos poros largos é coberta, principalmente, por grupos silanóis isolados. Nos poros largos, o aquecimento até 110°C produz grupos siloxanos a partir dos silanóis vicinais (Figura 2A). Os siloxanos são sítios absorventes fracos e não são importantes, no entanto, são reversivelmente transformados em SiOH com aquecimento na presença da água.

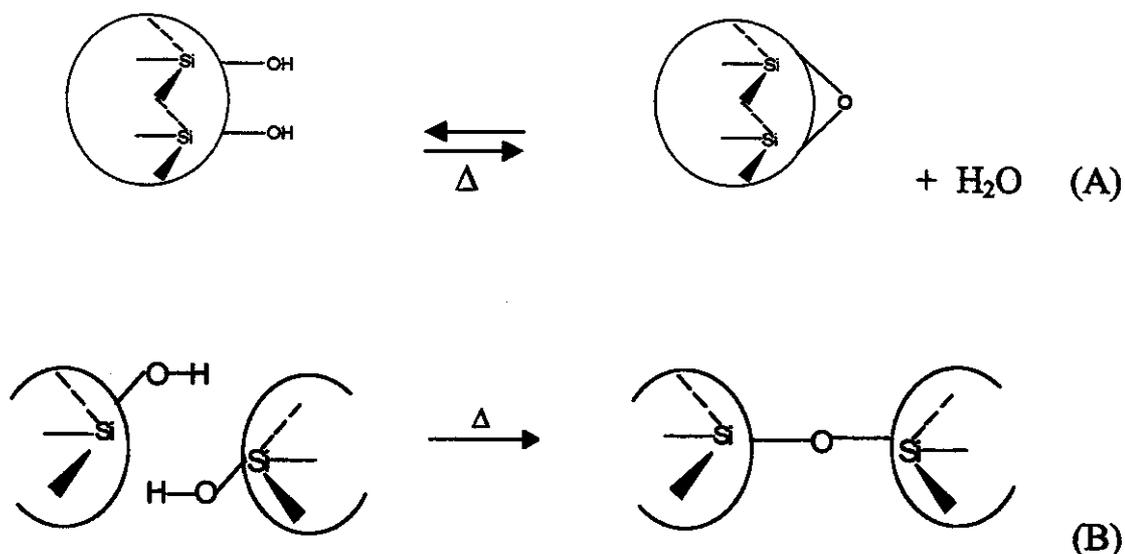


Figura 2. Formação dos grupos siloxanos nos macroporos da sílica (A) e nos microporos da sílica (B).

Nos poros estreitos, a água é eliminada por reações entre grupos hidroxilas nos sítios adjacentes (Figura 2B). A reação inversa não é possível e

há um efeito de diminuição na área superficial, devido ao efeito da ligação-cruzada.

A maioria das sílicas usadas em processos de adsorção, é composta de poros esféricos, com área superficial específica de 200-800 m² g⁻¹, tamanho dos poros de 4-400 nm e tamanho das partículas variando de 5 a 60 μm.

I.6.2. Adsorção sobre a Superfície da Sílica Funcionalizada

As propriedades de adsorção dessas sílicas funcionalizadas têm despertado grande interesse para fins analíticos⁷², uma vez que vários estudos demonstram que a maioria destes materiais apresenta grande capacidade de adsorção e seletividade. Esta última característica torna-se de grande importância para a realização de especificação⁷³. Estes materiais modificados são capazes de adsorver íons metálicos^{74,75}, bem como moléculas biológicas como: amino ácidos⁷⁶ e proteínas⁷⁷. A adsorção de moléculas orgânicas em fase aquosa sobre a sílica gel funcionalizada depende do pH do meio e, portanto, da carga elétrica criada na superfície da matriz adsorvente.

Como a adsorção é um importante processo verificado nos métodos de extração líquido-sólido envolvendo sílica modificada, parâmetros quantitativos, como capacidade de troca, devem ser avaliados.

A capacidade de troca é normalmente calculada por meio da determinação do N_f . Este parâmetro corresponde à capacidade máxima de adsorção do adsorbato por grama de sílica, sendo determinada pela equação (12)⁷⁸, onde: N_a corresponde ao número de moles iniciais do analito em solução, N_s ao número de moles do analito restantes na solução em equilíbrio e w , à massa de sílica modificada utilizada.

$$N_f = \frac{N_a - N_s}{w} \quad (\text{eq. 12})$$

O valor de N_f varia em função da temperatura (T) e da concentração de adsorbato (C). Para uma dada temperatura (constante), os gráficos que descrevem a função N_f com a C são denominados de isotermas, cujas análises fornecem informações relevantes, como mostrado na Figura 3.

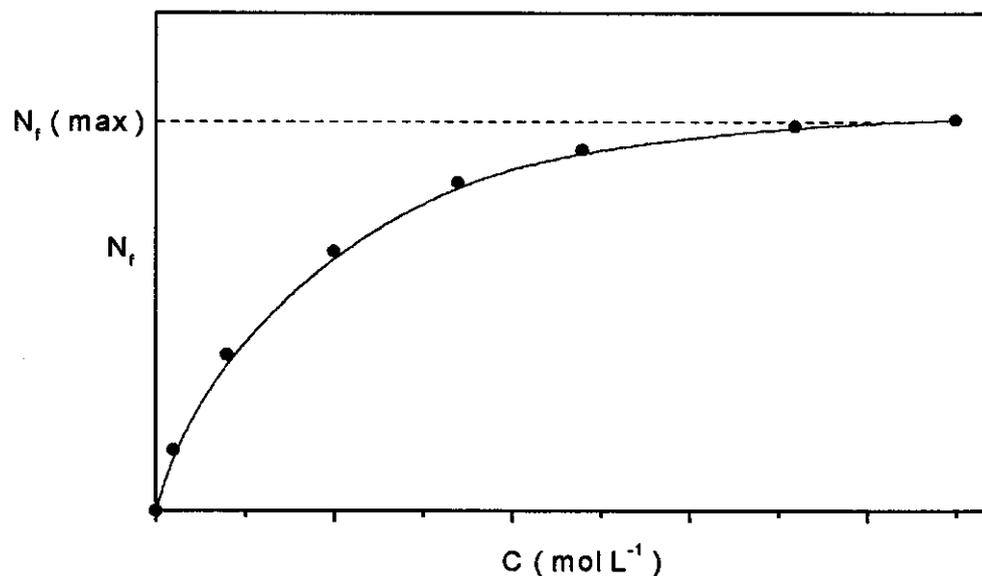


Figura 3. Isotherma de adsorção típica.

Na região de baixa concentração observa-se que a adsorção é praticamente proporcional às concentrações de equilíbrio. Em concentrações elevadas, os valores de N_f tendem a uma constante, da qual se determina a quantidade máxima de adsorção (N_f^{max}) de soluto na superfície do material adsorvente^{79,80}.

I.7. Uso da Sílica Funcionalizada em Métodos Cromatográficos

A cromatografia processada em sílica ou outro suporte com superfície modificada apresenta vantagens em relação aos suportes sem modificação, pois a seletividade da fase estacionária pode ser variada, empregando-se diferentes grupos funcionais, que podem ser imobilizados em suas superfícies.

As fases mais utilizadas em cromatografia líquida são: aminas $[-(\text{CH}_2)_n \text{NH}_2]$, nitrilas $[-(\text{CH}_2)_n \text{CN}]$, fenila $[-(\text{CH}_2)_n \text{C}_6\text{H}_5]$, octadecila $[-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]$, além de vários grupos trocadores de íons^{81,82}.

I.7.1. A Cromatografia Envolvendo Amino Ácidos e Proteínas.

A cromatografia de troca iônica (IEC) foi o primeiro método desenvolvido para uso em cromatografia líquida de alta eficiência, tendo sido originado da necessidade de melhorar as técnicas de análise de proteínas e amino ácidos.

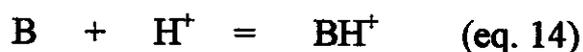
O emprego de trocadores iônicos com base em resina de sílica, a partir de 1970, trouxe melhorias significativas em métodos de purificação e separação, devido à sua grande resistência a altas pressões, bem como ao uso de partículas menores que as resinas de polímeros empregadas até então^{83,84}.

A IEC depende das interações entre as moléculas carregadas na fase estacionária e o soluto também carregado presente na fase móvel. Nesta técnica, os íons do soluto Y^{-1} competem com íons X^{-1} da fase móvel por sítios positivos (+) da fase estacionária, sendo denominada de cromatografia de troca aniônica. Analogamente, em cromatografia de troca catiônica, íons Y^{+} do

soluto competem com íons X^+ da fase móvel por sítios negativos (-) na fase estacionária.

A separação é alcançada porque os íons da amostra que interagem fracamente com o trocador iônico da fase estacionária serão retidos fracamente na coluna e serão eluídos com maior facilidade. Já o soluto que interage fortemente com o trocador iônico da fase estacionária será fortemente retido e será eluído por último⁸⁵.

Muitos compostos que apresentam cargas num determinado pH podem ser separados por troca iônica. Em geral, o equilíbrio ácido-base que é estabelecido pode ser representado pelas seguintes equações, onde HA representa um ácido e B uma base da fase estacionária:



O grau de retenção do soluto pode ser controlado através do pH da fase móvel. Em valores menores de pH, haverá alta concentração de H^+ , deslocando o equilíbrio da equação (13) para a esquerda e apenas baixa concentração de A^- competirá pelos sítios de troca iônica. Consequentemente, nestes casos ocorrerá uma rápida eluição de soluto ácido na coluna de troca iônica, pois este se encontrará praticamente em sua forma molecular, não podendo interagir de forma efetiva com os sítios ativos da matriz.

Em compostos anfotéricos, isto é, espécies que apresentam grupos ionizáveis com carga positiva e negativa, como os amino ácidos, a carga global efetiva depende também do pH. Quando esta carga for igual a zero tem-se o

ponto isoelétrico (pI). Em valores de pH menores que pI o composto apresentará carga efetiva positiva, podendo interagir ao trocador catiônico da fase estacionária. Ao contrário em valor de pH acima do pI, o composto apresentará carga efetiva negativa e poderá interagir ao trocador aniônico. Estas considerações são relevantes para proteínas e amino ácidos.

I.7.2. Algumas Considerações sobre a Cromatografia de Afinidade

A utilização da bioespecificidade de moléculas biológicas, explorada através da imobilização de grupos funcionais na fase estacionária, tem proporcionado o surgimento da cromatografia de afinidade. Este tipo de cromatografia tem tido grande emprego para a purificação de biomoléculas. A grande vantagem da cromatografia de afinidade está em priorizar as características das propriedades biológicas destas moléculas, mais que suas pequenas diferenças em termos de propriedades físico-químicas.

A complexidade e similaridade físico-química de muitos compostos de interesse biológico, tais como, proteínas, amino ácidos e ácidos nucleicos são apropriados à cromatografia de afinidade devido à alta especificidade e efeito de concentração, indispensáveis em técnica de separação de moléculas com atividades biológicas.

Desta forma, a cromatografia de afinidade tem considerável potencial e já é aplicada em estudos bioquímicos e químicos necessários na purificação destas moléculas. Essa cromatografia vem proporcionando um elegante método para purificações, através do controle do pH e da força iônica. A seletividade da técnica deriva tanto das interações com o ligante, como do uso de eluição apropriadas para cada caso.

O ligante, que exibe uma afinidade específica com o substrato, encontra-se ligado covalentemente à matriz de sílica gel. A teoria envolvida nesse método cromatográfico pode ser melhor entendida com o auxílio da Figura 4.

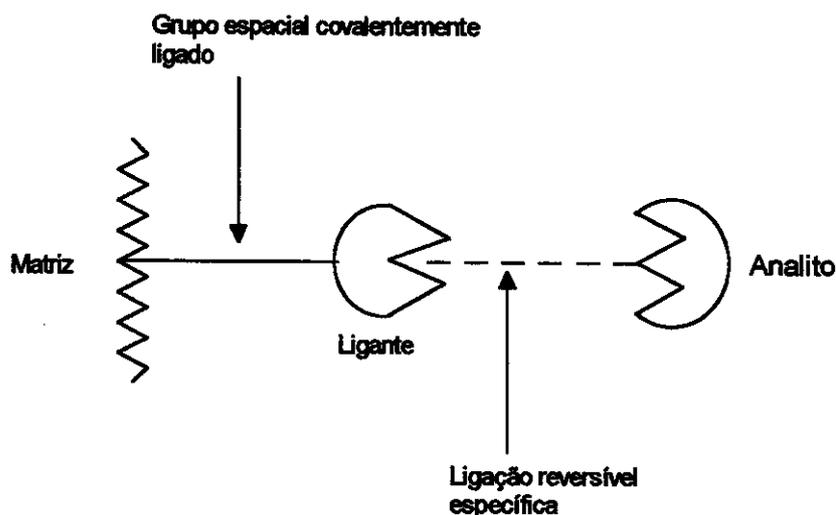


Figura 4. Esquema ilustrativo da cromatografia de afinidade.

As condições essenciais para esse tipo de cromatografia são: o ligante e a matriz devem ser estáveis às condições do experimento; a ligação ligante-substrato deve ser específica e reversível sobre as condições do experimento e a ligação ligante-matriz deve ser tal que as propriedades de adsorção específica do ligante não devem sofrer interferência da matriz.

I.8. Considerações sobre a Escolha dos Amino Ácidos

Na escolha dos amino ácidos (Figura 5) procurou-se evidenciar características de cada grupo, levando-se em consideração a polaridade dos

mesmos, que possivelmente levará a comportamentos diferentes quanto à adsorção na sílica modificada. De acordo com a divisão mais aceita, existem quatro classes principais de amino ácidos: aquela com grupos R não-polares ou hidrofóbicos; a com grupos R neutros (sem carga) polares; a com grupos R carregados positivamente e aquela com grupos R carregados negativamente.

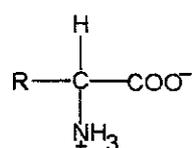


Figura 5. Fórmula estrutural geral dos amino ácidos. Em azul, parte da estrutura comum a todos eles.

O primeiro amino ácido selecionado foi a glicina, Figura 6 (a), por ser o mais simples. Além desta característica, foi escolhido por conter os grupamentos amínico e carboxílico mais disponíveis para o processo de adsorção sobre a superfície da sílica modificada, proporcionando melhor compreensão deste fenômeno. A leucina, Figura 6 (b), por sua vez, faz parte da classe dos amino ácidos com grupos R não-polares (hidrofóbico). Esse grupo apolar, provavelmente, adsorverá de maneira diferente da glicina, devido ao seu caráter hidrofóbico, característica importante para se analisar comparativamente as adsorções destes dois amino ácidos.

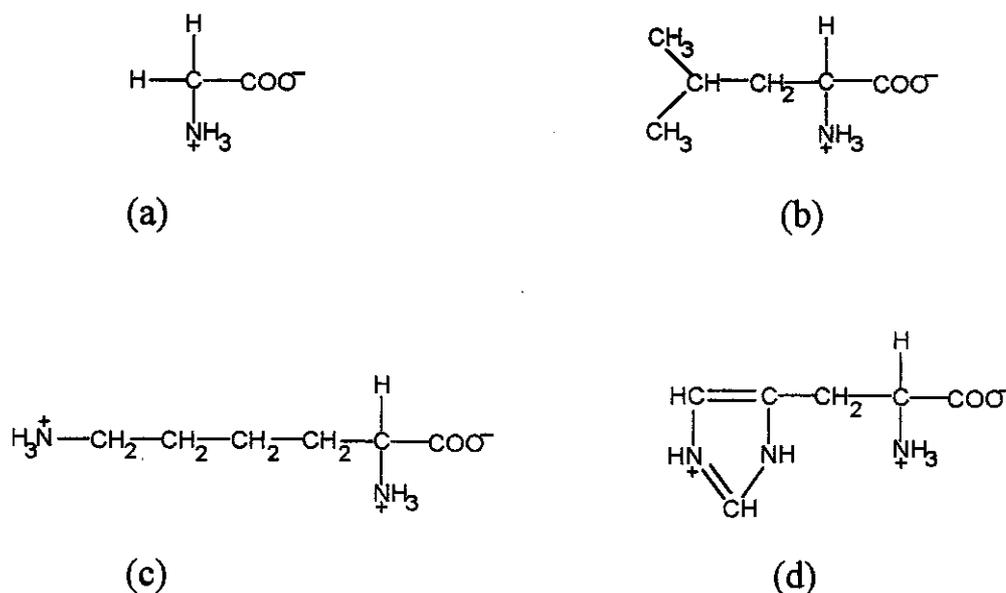


Figura 6. Glicina (a); leucina (b); lisina (c) e histidina (d).

Para os outros amino ácidos escolhidos, tomou-se como base as propriedades de troca-iônica dos grupos imobilizados na sílica gel. Sabendo-se que os grupos proporcionam troca de cátions, foram escolhidos mais dois amino ácidos que possuíssem grupos R carregados positivamente. A lisina, Figura 6 (c) com um aminogruppo consideravelmente básico, cede seus prótons somente a pH muito elevado, sendo que, em pH 7, apresenta uma carga positiva efetiva. A histidina, Figura 6 (d), por sua vez, que contém a função imidazol fracamente básica, possui 50% de suas moléculas com grupos R positivamente carregados em pH 6, enquanto que, em pH 7, somente 10% de seus grupos R são positivos. Assim possibilita uma melhor utilização da influência da variação do pH.

I.8.1 Propriedades Ácido-Base dos Amino Ácidos

As propriedades ácido-base dos amino ácidos são de muita importância para um melhor entendimento nos processos de separação, identificação e quantificação, sendo portanto, necessário seu prévio conhecimento.

Nas curvas de titulação dos amino ácidos, os valores de pK_a da ionização em duas ou mais etapas são suficientemente afastados para permitirem a observação de fases distintas. Isso significa que se pode calcular as relações entre as espécies iônicas de um amino ácido em qualquer pH, uma vez que se conheça os valores dos pK_a . Esses dados também permitem identificar o ponto isoelétrico (pI).

Nos quatro amino ácidos selecionados, tem-se os seguintes pK apresentados na Tabela abaixo:

Tabela 1. Valores de pK e pI dos amino ácidos utilizados.

Amino ácido	pK_1 (α -COOH)	pK_2 (α -NH ₃ ⁺)	pK_r	pI
Glicina	2,34	9,6		5,97
Leucina	2,36	9,6		5,98
Histidina	1,82	9,17	6,0	7,59
Lisina	2,18	8,95	10,53	9,74

É importante notar que essas propriedades ácido-base são bastante exploradas nos métodos de separação, identificação e purificação, principalmente, nos métodos cromatográficos.

Estas características dos amino ácidos são propriedades importantes para o desenvolvimento do projeto, já que, o propósito principal deste não é a pura e

simples busca de uma fase estacionária capaz de separar amino ácidos, mas sim, um estudo de algumas das propriedades de adsorção dessas moléculas na intenção de contribuir para um melhor entendimento das propriedades de adsorção de moléculas biológicas frente à matriz. Tendo em vista que o domínio deste tipo de conhecimento tornará muito mais fácil a escolha da matriz e do grupo a ser imobilizado sobre a sua superfície para a separação e purificação de amino ácidos e moléculas biológicas de uma amostra.

II. OBJETIVOS

O trabalho inicial partiu da observação das possibilidades de funcionalização da superfície da sílica gel, buscando explorar as características favoráveis ao processo de adsorção. Isto, associado à necessidade de ampliar os conhecimentos na área de adsorção de moléculas biológicas, em matrizes modificadas, para possíveis aplicações em métodos de separação e purificação.

Outro aspecto importante a ser citado é o custo final nos produtos de alguns tipos de indústrias, tais como, farmacêutica e alimentícia. A dificuldade em separar e purificar tais moléculas influencia diretamente no preço final do produto ao consumidor. Assim, diante da realidade citada acima, pensou-se num estudo com biomoléculas (amino ácidos), que pudesse avaliar seu comportamento de adsorção frente a superfícies de sílica modificada.

Para tanto, os objetivos do projeto foram:

- Modificar a superfície da sílica gel com grupos aminopropil-benzenossulfonato, óxido de zircônio, óxido de nióbio e fosfato de zircônio.
- Caracterizar as superfícies modificadas por técnicas físico-químicas.
- Verificar o comportamento de adsorção dos amino ácidos pelas sílicas modificadas.
- Estudar a influência do pH do meio na adsorção destes amino ácidos.
- Verificar as características de eluição de misturas de amino ácidos em coluna.
- Comparar o comportamento destes amino ácidos frente à adsorção nas sílicas modificadas e relacionar com as características de cada sistema.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reagentes Utilizados

- Acetona (Merck)
- Ácido clorídrico (Nuclear)
- Ácido fosfórico (CRQ)
- Amino ácidos: Glicina, Leucina, Histidina e Lisina (Sigma), utilizados sem tratamento prévio
- 3- Aminopropiltriétoxissilano (Aldrich)
- Dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma), utilizado sem tratamento prévio
- Etanol anidro (Merck)
- Fosfato monobásico (Synth)
- Fosfato bibásico (Synth)
- Fosfato de Sódio - (Nuclear). Previamente seco a 100°C por duas horas
- Hidróxido de sódio (Vetec)
- Nitrato de prata (Synth)
- Nitrito de sódio (Ecibra)
- Para-benzoquinona, PBQ (Merck)

Para o emprego deste reagente foi preciso sua sublimação em linha de vácuo, em decorrência da sua fácil oxidação. Na preparação da solução em dimetilsulfóxido (DMSO), não é recomendável sua estocagem, pois oxidará em curto espaço de tempo

- Pentacloreto de nióbio (Aldrich)
- Oxiclорeto de Zircônio Hexahidratado (Fluka), utilizado como recebido

- Sílica Gel

Sílica gel (Fluka) com granulometria na faixa de 35-70 mesh, diâmetro médio de poros de 60 Å e uma área superficial específica (S_{BET}) de 500 m^2g^{-1} . Esta sílica foi previamente ativada, ou seja, a água adsorvida fisicamente ou ligada por ponte de hidrogênio aos grupos hidroxilas foi removida por aquecimento a 150°C, durante 2 horas

- Tetracloreto de carbono (Nuclear)
- Tetracloreto de zircônio (Fluka)
- Tolueno (Synth)

III.2. Equipamentos

- 1) Agitador Mecânico da Fisatom (Modelo A250).
- 2) Analisador de Área Superficial Específica (BET) da Micromeritics Instrument Corporation (Modelo FlowSorb 2300).
- 3) Analisador Elementar da Perkin-Elmer (Modelo 2400).
- 4) Balança Analítica da Fisher-Scientific (Modelo A250).
- 5) Cromatógrafo Líquido da Aminochrom II (Modelo Type OE-914).
- 6) Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva SPECTRACE 5000.
- 7) Espectrômetro de Infra-vermelho da Perkin-Elmer (Modelo 1600 FTIR).
- 8) Espectrômetro da Pharmacia Biotech (Modelo Ultrospec 2000).
- 9) Micropipeta da Labsystems (Modelo Finnpiptette Colour 4027).
- 10) Potenciômetro da Corning (Modelo Analyzer 350), equipado com eletrodo combinado de vidro, calomelano saturado e sensor de temperatura.

III. 3. Preparação das Matrizes de Adsorção

III.3.1. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Zircônio Hidratado⁸⁶

Cerca de 50 g de sílica gel ativada foram adicionados a uma solução contendo 11,6 g (0,05 mol) de tetracloreto de zircônio, previamente dissolvido em 300 mL de etanol. A mistura foi mantida em refluxo por 8 h à temperatura de, aproximadamente, 80 °C, com agitação mecânica.

O sólido resultante foi lavado por decantação e, então, seco a 150°C durante 4 h. Posteriormente, o material foi cuidadosamente hidrolisado (água demineralizada) e depois lavado até a remoção completa dos íons cloreto da sílica modificada. O filtrado foi testado com solução de nitrato de prata 0,1 mol L⁻¹ em meio ácido, até que não ocorresse mais precipitação de cloreto de prata.

O sólido resultante, após a lavagem, foi recolhido e seco em estufa por cerca de 4 h à temperatura de aproximadamente 110°C. Esse material obtido foi denominado de SZ.

III.3.2. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Fosfato de Zircônio⁸⁶

A modificação da superfície da sílica com fosfato de zircônio foi realizada em duas etapas. Inicialmente, foi feita a modificação da sílica com o zircônio, conforme descrito no item anterior (III.3.1). Para o enxerto de fosfato sobre a superfície da sílica gel foram adicionados 20 g da sílica anteriormente modificada em cerca de 200 mL de uma solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹. A mistura foi mantida sob agitação mecânica durante 8 h. O sólido

resultante foi lavado e filtrado com água, e por último seco em estufa a 100°C por 5 h. Este material obtido foi denominado de SZP.

III.3.3. Modificação da Superfície da Sílica Gel com Óxido de Nióbio (V)¹⁰

Cerca de 22 g de NbCl₅ (0,081 mol) foram lentamente adicionados em 300 mL de tetracloreto de carbono e 40 mL de etanol anidro. Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente até dissolução total do sólido.

Após esta etapa, cerca de 50 g de sílica ativada foram adicionados, e a mistura resultante foi refluxada por 20 horas sob constante agitação. O produto da reação foi filtrado, lavado com tetracloreto de carbono e etanol e, então, seco por 4 h à temperatura de 140°C. O material seco foi imerso em água bidestilada por várias horas. O produto final, denominado SN, foi então seco à temperatura de 100 °C por quatro horas.

III.3.4. Modificação da Sílica Gel com Grupos Aminopropil-Benzenossulfonato

A modificação da superfície da sílica com grupos aminopropil-benzenossulfonato foi realizada em duas etapas.

Cerca de 50 g da sílica gel previamente ativada e 10 mL de 3-aminopropiltriétoxissilano foram adicionados a 250 mL de tolueno. Esta mistura foi mantida em refluxo por 12 horas, a 70°C. O material obtido após ser filtrado e lavado respectivamente em tolueno, etanol e acetona, foi denominado de aminopropilsílica gel⁸⁷.

Numa etapa posterior, foi preparada uma solução de 4-diazobenzenossulfônico, por meio da adição de 6,00 g de ácido 4-aminobenzenossulfônico com 12,00 g de NaNO₂ e 48 mL de HCl concentrado

em 120 mL de água destilada em banho de gelo e agitação por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 g de aminopropilsílica gel a esta solução do diazobenzenossulfônico, sendo que essa mistura foi mantida em contato por 10 minutos. O material obtido, denominado SABS, foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 70°C, por cerca de 2 horas.

III.4. Caracterização das Sílicas Modificadas

III.4.1. Caracterização das Sílicas Modificada com Óxido de Zircônio, Fosfato de Zircônio e Óxido de Nióbio⁸⁸

Para caracterizar estas sílicas foram realizadas medidas de área superficial específica e quantificados os grupos por Fluorescência de Raios-X.

Para a determinação quantitativa por Fluorescência de Raios-X, foram preparados padrões com misturas de sílica gel, oxiclreto de zircônio hexahidratado e fosfato de sódio previamente seco a 100 °C. Tomou-se a precaução quanto ao controle da granulometria dos reagentes. Para tal, todos os reagentes e amostras foram peneirados e somente os materiais com granulometria na faixa de 60-80 mesh foram utilizados.

Padrões na faixa de 0,30 - 4,50 g de zircônio / 100 g de amostra e 0,50 – 5,40 g de fosfato / 100 g de amostra foram então preparados por simples pesagem em balança analítica, com posterior homogeneização. A Tabela 2, mostra a quantidade de cada reagente utilizado.

Tabela 2. Dados dos padrões para quantificação de Zircônio e Fosfato.

Padrão	Massa de SiO ₂ (g)	Massa de ZrOCl ₂ .6H ₂ O (g)	Massa de Na ₂ HPO ₄ (g)
P1	2,9506	0,0309	0,0221
P2	2,9107	0,0606	0,0303
P3	2,8710	0,0905	0,0406
P4	2,8322	0,1215	0,0503
P5	2,7918	0,1508	0,0601
P6	2,5814	0,3001	0,1206
P7	2,3416	0,4223	0,2410

Para a construção da curva de calibração e posterior quantificação de zircônio, fosfato e nióbio adsorvidos na sílica, foram utilizados parâmetros otimizados de irradiação para esses elementos, conforme observado na Tabela 3:

Tabela 3. Parâmetros otimizados de irradiação para a determinação de Zr, P e Nb.

Parâmetro	Zr	P	Nb
Voltagem do tubo de raios-x (kV)	30	10	30
Corrente (mA)	0,05	0,05	0,01
Filtro	Cinco	Nenhum	Fino
Tempo de irradiação (s)	100	100	150
Atmosfera	Ar	Vácuo	Ar
Tempo de pré-aquecimento (s)	5	5	5

Observação: O filtro cinco corresponde a 0,127 mm de Rh e o filtro fino corresponde a 0,05 mm de Rh.

Para a quantificação de nióbio na superfície da sílica modificada não foi preciso a preparação de padrões específicos, isso porque o padrão analítico disponível no aparelho, a alta resolução espectral, a técnica ser pouco suscetível a interferentes para o nióbio, e a utilização de condições otimizadas, foram suficientes para a quantificação deste na superfície da sílica.

III.4.2. Caracterização da Sílica com Grupos Organofuncionais

III.4.2.1. Determinação de Nitrogênio

A sílica modificada com grupos aminopropil-benzenossulfonato foi submetida à determinação de nitrogênio, para estimar as quantidades de grupos orgânicos funcionalizados na superfície da mesma. Essas determinações foram realizadas pelo método de Kjeldhal⁵⁴.

III.4.2.2. Espectros Vibracionais

O espectro de absorção na região de infravermelho desse material foi obtido pelo método de disco auto-suportado como descrito por Gushikem e colaboradores⁸⁹, usando um espectrômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer modelo 1600.

III.5. Otimização das Condições de Análise dos Amino Ácidos^{90,91}

O método é baseado na análise comparativa da absorbância máxima do produto da reação entre a PBQ e o amino ácido, inicialmente para soluções padrões de amino ácidos sem a sílica modificada e posteriormente com soluções contendo a sílica. O espectro apresenta uma banda de transferência de carga em 490 nm, mostrando variações à medida que são alteradas algumas condições como: a concentração, o tempo de reação e o pH da solução³³. A PBQ, purificada via sublimação a vácuo, foi utilizada na preparação de solução 0,1 mol L⁻¹ em DMSO, no mesmo dia de sua utilização.

Para a construção da curva analítica foram adicionadas alíquotas de 2,0 mL de soluções de referência na faixa de 0,75 à 10,00 mmol L⁻¹ mais 2 mL de tampão fosfato pH 6 e 50 µL da solução de PBQ 0,1 mol L⁻¹.

Estas soluções foram, a seguir, aquecidas a 100 °C, por aproximadamente 10 minutos, para o desenvolvimento da cor, sendo que as leituras em unidade de absorbância foram efetuadas em 490 nm.

III.6. Cinética de Adsorção dos Amino Ácidos⁷²

Para a determinação do tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio (entre o material adsorvente e a solução de amino ácido) foram feitos testes através da adição de 50 mL de solução de amino ácido (5 mmol L⁻¹), no caso glicina, em contato com 0,2 g da sílica modificada durante 5, 10, 20, 30 e 40 minutos de agitação. Após a completa decantação, 2 mL do sobrenadante

foram coletados para análise de amino ácido remanescente em solução, pelo método espectrofotométrico descrito anteriormente (II.5).

III.7. Obtenção das Isotermas de Adsorção dos Amino Ácidos

Após o conhecimento da cinética do sistema de adsorção, partiu-se para os experimentos em batelada a diferentes concentrações de amino ácidos, a fim de se determinar a capacidade máxima de adsorção do material. Para isto, 0,2 g de sílica gel modificada foi pesada e posta em contato com cada uma das soluções de diferentes concentrações do amino ácido (0,75; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50 e 10,00 mmol L⁻¹), mantendo em agitação mecânica por 30 minutos. Após decantação, foram coletados 2 mL do sobrenadante para a determinação da quantidade de amino ácidos. A mesma seqüência de experimento foi feita para os amino ácidos glicina, leucina, histidina e lisina.

III.8. Determinação da Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos

Foram preparadas soluções do amino ácido (um dos quatro amino ácidos) na concentração de 7,5 mmol L⁻¹, com soluções tampão com valores de pH na faixa de 1,0 a 6,0 com incremento de uma unidade de pH. Destas soluções, 50 mL foram postos em agitação constante, por um período de 30 minutos, com 0,2 g de sílica modificada. Posteriormente, foi ajustado o pH da alíquota da solução sobrenadante a 6 e realizada as determinações de amino ácidos. A partir da diferença entre a concentração inicial e a final, foi calculada a quantidade adsorvida de amino ácido em cada valor de pH avaliado.

III.9. Estudo da Eluição de Misturas Binárias de Amino Ácidos em Coluna

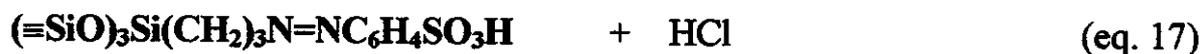
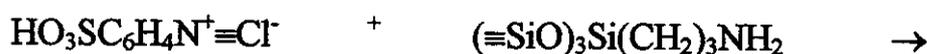
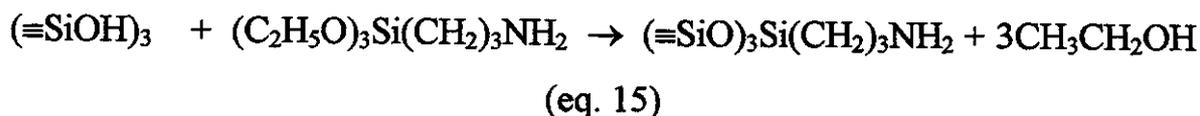
Com este experimento, procurou-se avaliar a possibilidade de separação cromatográfica da mistura de dois amino ácidos, seguido pela análise de adsorção relativa destes analitos, a fim de verificar se a sílica modificada apresenta alguma seletividade.

No procedimento em questão foi utilizada uma coluna de 6 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro, a qual foi preenchida com aproximadamente 0,7 g de sílica modificada (SABS ou SZP). Como fase móvel, foi utilizada a mesma solução tampão empregada na preparação da solução dos amino ácido em valor de pH conhecido. Posteriormente, 1 mL do eluído foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

IV.RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1.Caracterização da Sílica Modificada com Grupos Aminopropil-benzenossulfonato (SABS)

A reação para modificação da superfície da sílica gel com grupos aminopropil-benzenossulfonatos pode ser representada conforme reações abaixo:



A aminopropilsílica gel obtida, na primeira etapa da reação (eq. 15), apresentou uma coloração branca característica, observada em trabalhos anteriores⁹². A análise de nitrogênio realizada nesse material, forneceu uma quantidade de grupos aminos ligados à superfície da sílica gel de 0,65 mmol g⁻¹.

A sílica gel quimicamente modificada com grupos 4-aminopropilbenzenossulfonato (eq. 17) apresenta coloração alaranjada,

característica de compostos que apresentam ligação $-N=N-$. A partir da análise elementar do material, foi determinada a quantidade de grupos sulfônicos como sendo de $0,65 \text{ mmol g}^{-1}$, indicando que a reação de imobilização destes grupos foi bastante eficiente. Somado a isto, foi possível verificar, pelo espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 7), uma banda bastante intensa a 1521 cm^{-1} , característica de anel aromático, reforçando a hipótese da imobilização do grupo aminopropil-benzenossulfonato.

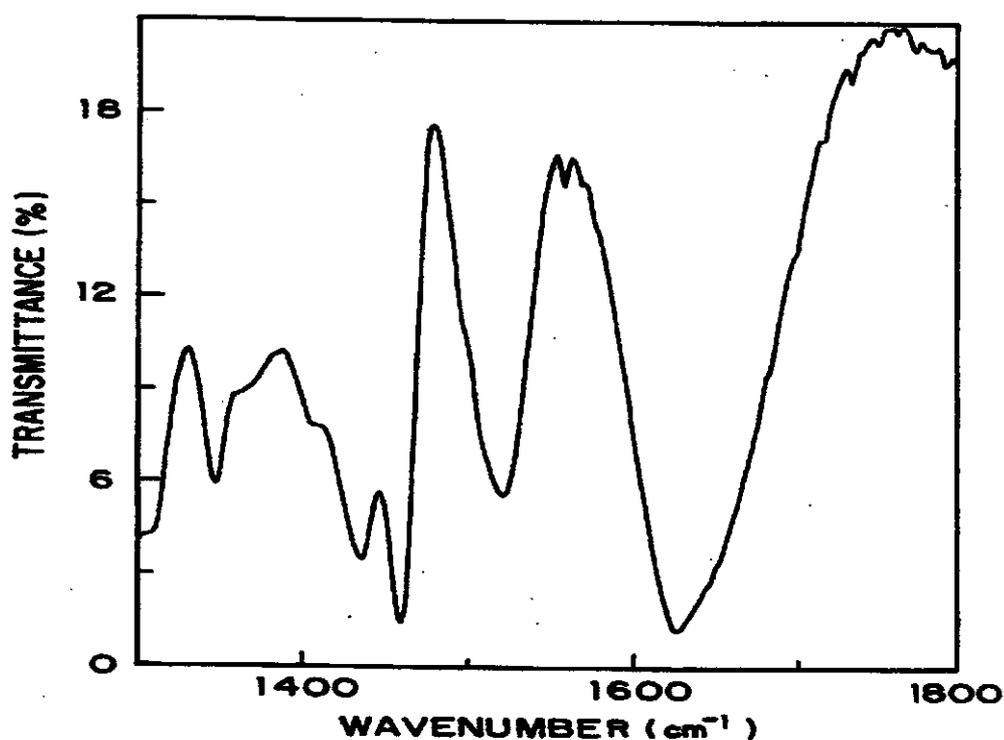


Figura 7. Espectro na região de infravermelho da sílica SABS.

Os grupos sulfonatos, presentes na sílica modificada, conferem novas propriedades a ela, devido ao fato de serem facilmente ionizáveis. Estudos realizados para verificar a estabilidade do material em soluções aquosas,

mostraram que não ocorre nenhuma perda significativa de grupos orgânicos, sendo este material possível de ser utilizado como trocador iônico, devido às suas características. No entanto, em pH abaixo de 2, pequena lixiviação por hidrólise foi observada. A capacidade de adsorção também diminuiu cerca de 10%, após usada por mais de 4 vezes.

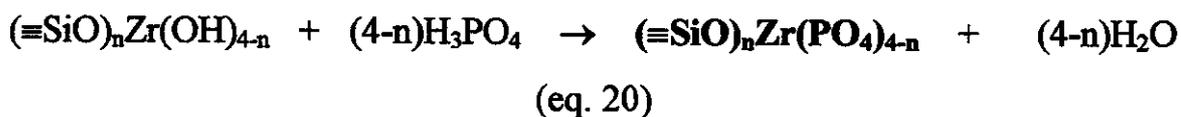
IV.2. Caracterização da Sílica Modificada com Óxido de Zircônio (Sílica SZ) e com Fosfato de Zircônio (Sílica SZP)

A reação para a modificação da superfície da sílica gel com óxido zircônio pode ser representada como segue abaixo:



Por outro lado, o dióxido de zircônio tem recebido considerável atenção como um modificador de superfície, isso porque ele dispõe de força moderadamente ácida, desta forma, é empregado em uma grande variedade de processos catalíticos e suas propriedades de superfície têm sido caracterizadas⁵⁰.

A representação da reação genérica da modificação da superfície da sílica com fosfato de zircônio é representada por duas etapas: a primeira modificação é a mesma indicada nas equações 18 e 19 e a segunda etapa segue abaixo:



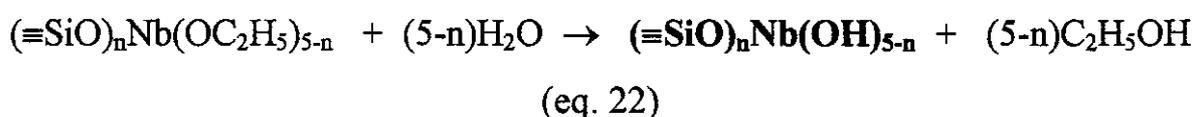
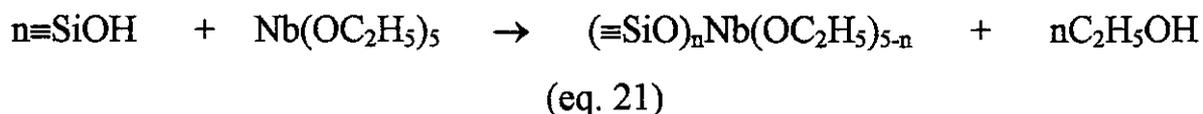
A caracterização destas duas sílicas modificadas foi feita através da EDXRF. Para isto, foi necessário o uso de padrões analíticos para a determinação quantitativa desses elementos, os quais apresentaram valores em porcentagem de 5,17 % para o zircônio e 4,18 % para o fosfato, correspondendo a 0,57 e 0,45 mmol g⁻¹, respectivamente. Tendo em vista que a reação entre a sílica zircônio e o grupo fosfato ocorre na proporção de 1:1, e que os resultados experimentais levaram a uma relação 1:0,8, é possível afirmar que a reação se processa com boa eficiência. Provavelmente a pequena diferença entre os valores decorre da inacessibilidade de alguns zircônio pelo fosfato.

Foi realizada ainda uma análise de área superficial da sílica modificada através do método BET, na qual as áreas encontradas foram de 474 e 513 m² g⁻¹ para SZ e SZP respectivamente. Para a sílica modificada com zircônio e com fosfato de zircônio, as variações nestes valores estão de acordo com as observadas por Gushikem e colaboradores⁹³.

IV.3. Caracterização da Sílica Gel Modificada com Óxido de Nióbio¹⁰ (Sílica SN)

Embora o NbCl₅ seja insolúvel em tetracloreto de carbono, a adição de álcool etílico produz substituição do cloro, resultando em NbCl_{5-n}(OC₂H₅)_n.

Essa última espécie é solúvel em tetracloreto de carbono, o qual é utilizado como meio reacional.



No aquecimento do composto obtido $(\equiv\text{SiO})_n\text{Nb}(\text{OH})_{5-n}$, a água fisicamente adsorvida é eliminada a 150°C e acima dessa temperatura a água estrutural que surge da reticulação da superfície do óxido de nióbio e da sílica é eliminada⁹⁴. Por isso, para evitar uma reticulação extensiva, a amostra é sempre seca a uma temperatura inferior a 250°C.

A quantificação de nióbio presente na superfície da sílica, após a modificação, foi determinada pela técnica EDXRF, apresentado 0,80 mmol g⁻¹.

Na análise da nova área superficial desta sílica foi encontrado o valor de 486 m² g⁻¹ pelo método BET.

A Tabela 4 apresenta os dados discutidos até o momento. Sabendo-se que a sílica gel utilizada apresentou uma área superficial de 507 m² g⁻¹, foi possível notar uma diminuição na área superficial das sílicas modificadas, com exceção da SZP. Isto pode estar relacionado com o processo de imobilização dos grupos na superfície da sílica gel, que pode provocar o bloqueio dos poros mais finos, bem como a coalescência de alguns poros, diminuindo a área superficial da mesma³⁴. O mesmo comportamento não é observado para a

sílica SZP, que em outros trabalhos também apresentou área igual ou maior que a sílica gel pura, sem modificação.

Tabela 4. Resultados da quantificação dos grupos imobilizados na superfície da sílica gel (mmol g^{-1}) e da área superficial pelo método BET ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

Sílica	Área superficial (BET)	Quantidade de grupos suportados
SABS	378	0,65
SN	486	0,80
SZ	474	0,57
SZP	513	0,45

IV.4. Cinética de Adsorção dos Amino Ácidos

A análise da Figura 8 revela que as sílicas SABS e SZP atingem o equilíbrio mais rapidamente, entre 20 e 25 minutos, provavelmente devido à melhor afinidade dos grupos sulfonato e fosfato em interagir com os amino ácidos. Já as sílicas SN e SZ, por apresentarem menor capacidade de interação com os amino ácidos, levam cerca de 30 minutos para atingir o equilíbrio. No entanto, a cinética de adsorção é bastante satisfatória para todas as cinco sílicas empregadas, quando comparadas com outros materiais⁹⁵. Provavelmente, esse comportamento cinético deve-se ao fato da homogeneidade dos poros, ou da distribuição homogênea e da exposição dos sítios de adsorção na superfície do material⁷².

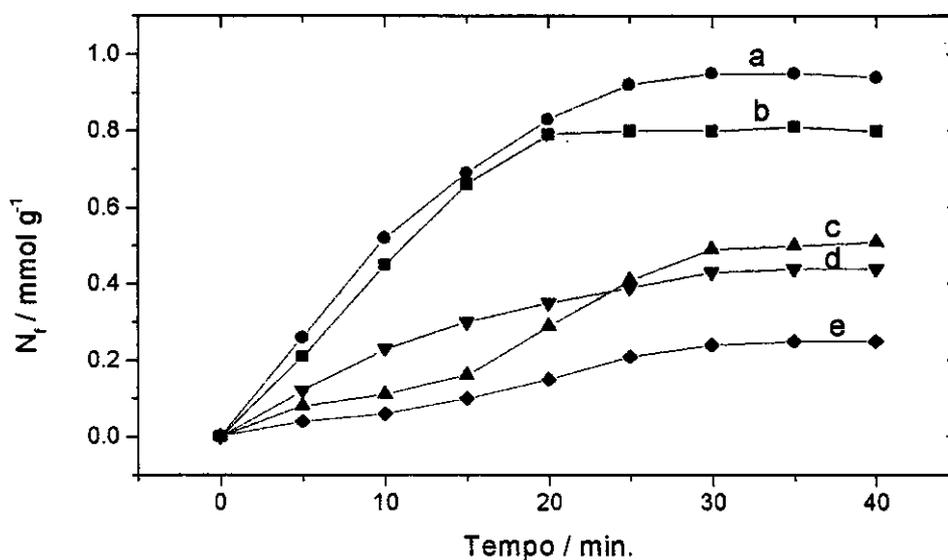


Figura 8. Curvas de adsorção da glicina em função do tempo para as diferentes sílicas: SABS (a); SZP (b); SZ (c); SN (d) e sílica gel (e).

IV.5. Análise do Comportamento de Adsorção em Função da concentração

A cromatografia de troca iônica tem sido utilizada na separação de amino ácidos⁹⁶. Os grupos $-\text{SO}_3\text{H}$, $\equiv\text{Zr}(\text{PO}_4)_n$, $\equiv\text{ZrOH}$ e $\equiv\text{NbOH}$, imobilizados sobre a superfície da sílica, tornam a mesma carregada negativamente devido à dissociação de íons H^+ em um determinado pK. Desta forma, atuam como um trocador catiônico, promovendo a retenção de espécies positivas como os amino ácidos, quando estão em pH abaixo de seus pontos isoelétricos.

IV.5.1. Adsorção pela Sílica SABS

A sílica gel modificada com grupos aminopropil-benzenossulfonato apresenta, na sua superfície, grande disponibilidade de carga negativa, portanto, seria de se esperar que a mesma atraísse mais fortemente moléculas com maior carga positiva efetiva. Para o primeiro estudo envolvendo a variação da concentração dos amino ácidos, foram obtidos os seguintes valores de adsorção, para a glicina $1,39 \text{ mmol g}^{-1}$; histidina $0,82 \text{ mmol g}^{-1}$; lisina $0,65 \text{ mmol g}^{-1}$ e leucina $0,54 \text{ mmol g}^{-1}$, conforme indicado na Figura 9.

Vale ressaltar que essa etapa do experimento foi realizada com as soluções nos pH obtidos pela simples dissolução dos amino ácidos em água, ou seja, em torno de pH 6,0. Neste meio, a histidina apresenta carga líquida positiva devido à protonação do grupo imidazol, podendo participar efetivamente do processo de troca iônica com os grupos sulfonatos da sílica modificada. Por sua vez, a leucina possui grupo R apolar, não apresentando carga líquida positiva em valores de pH elevado.

Além do pH, um outro fator que pode contribuir para essa diferença é o tamanho do amino ácido, entretanto, deve-se ressaltar que a quantidade de amino ácidos adsorvida pelo material é superior ao da quantidade de grupos sulfônicos. Esse fato, provavelmente, é devido ao processo de invasão, fenômeno já verificado no caso da adsorção de íons metálicos.²⁴

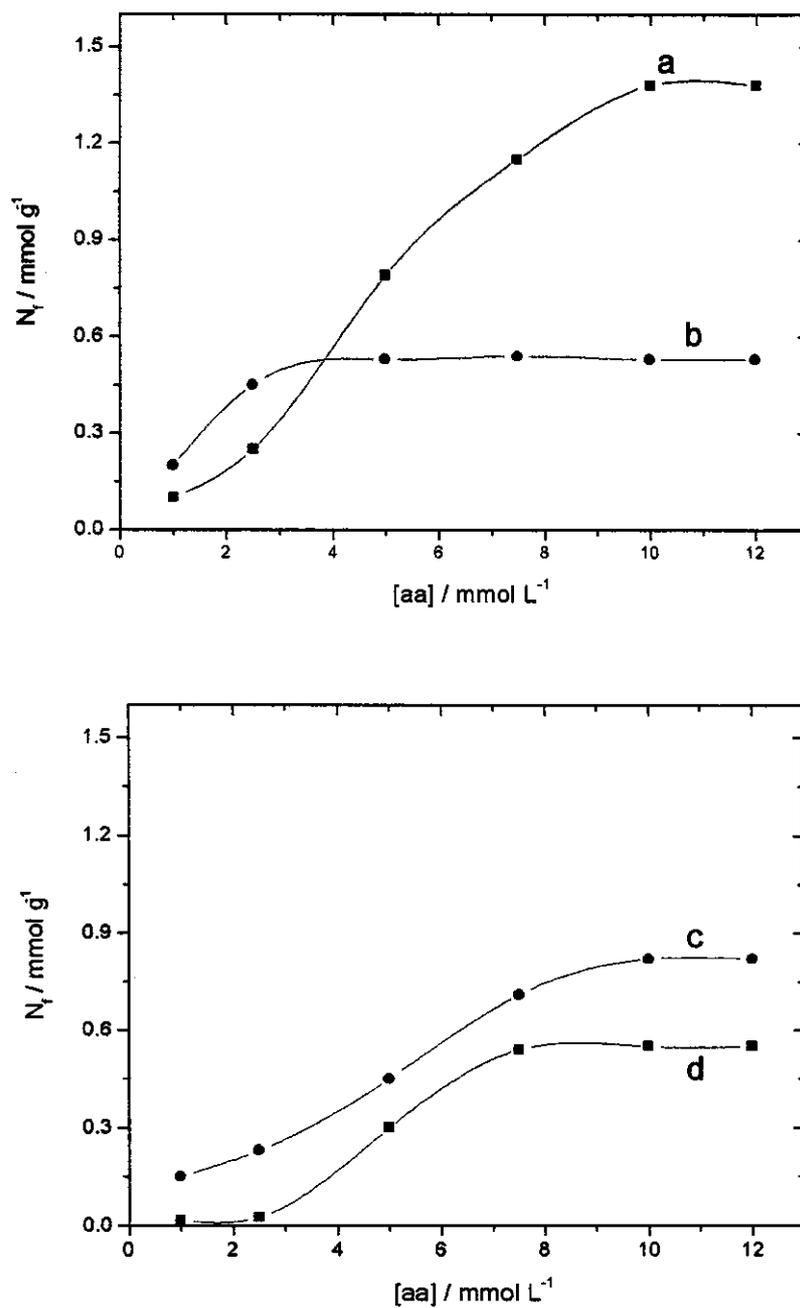


Figura 9. Isothermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SABS em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

Na análise global para os quatro amino ácidos adsorvidos pela sílica SABS, a glicina apresentou o maior valor de N_f . Esse comportamento pode ser atribuído ao tamanho do amino ácido (adsorção por invasão) e também, às suas cargas. Na sequência tem-se a seguinte ordem na capacidade de adsorção: histidina, lisina e leucina. A baixa adsorção da lisina deve estar relacionada ao seu maior tamanho. No entanto, seria de se esperar maior adsorção pois suas propriedades químicas são semelhantes a da histidina (grupo R polar e carregado positivamente). Neste aspecto, é verificada a diferença de afinidade e/ou maior caráter seletivo da sílica modificada. Já a baixa capacidade da leucina, pode ser atribuída ao fato dela possuir um grupo apolar em sua estrutura.

IV.5.2. Adsorção pela Sílica SN

Nesta superfície, o comportamento da adsorção em função da concentração segue um padrão um pouco mais homogêneo, apresentando uma variação menor entre os amino ácidos, bem como respostas mais semelhantes para amino ácidos de estruturas similares, glicina/leucina e histidina/lisina.

A sílica SN, modificada com óxido de nióbio, não desenvolveu boa adsorção para os amino ácidos usados em comparação a sílica SABS. É provável que, para a adsorção dessas moléculas, não baste a presença dos grupos $\equiv\text{NbOH}$ com poder de adsorção por troca catiônica. Nestes casos, é importante a presença de um grupo com maior capacidade de realizar interações na superfície da matriz, para proporcionar as interações complementares exigidas pelos amino ácidos. Desta forma, a sílica SN desenvolveu baixa capacidade de adsorção e pouca possibilidade de

seletividade. As capacidades máximas de adsorção encontradas foram: glicina 0,45 mmol g⁻¹; leucina 0,41 mmol g⁻¹; lisina 0,34 mmol g⁻¹ e histidina 0,29 mmol g⁻¹, como mostrado na Figura 10.

A sílica SN apresentou um comportamento não esperado pela troca iônica. Todavia deve ser lembrado que neste experimento não houve controle do pH. Os dois amino ácidos de menor carga positiva apresentaram maior adsorção, leucina e glicina. Este comportamento comprovou que a adsorção não é regida apenas pela troca iônica, mas sim por interações complementares das moléculas com a superfície da sílica modificada. Por último, com relação ao processo de troca iônica, foi observada a baixa afinidade da lisina e histidina, sendo esperada alta adsorção; esse resultado pode ser atribuído à baixa absorção e solubilidade nas paredes da sílica gel modificada, impossibilitando-os de desenvolver a troca iônica.

IV.5.3. Adsorção pela Sílica SZ

A sílica SZ, como a SN não apresentou grande capacidade de adsorção, comparada a sílica SABS. Provavelmente a falta de um grupo com maior disponibilidade de carga para realizar interações diferenciadas com os amino ácidos, levou à pequena capacidade de adsorção e pouca possibilidade de seletividade entre os amino ácidos utilizados. Foram observados os seguintes resultados para a adsorção máxima: glicina 0,49 mmol g⁻¹, leucina 0,44 mmol g⁻¹, histidina 0,37 mmol g⁻¹ e lisina 0,34 mmol g⁻¹, conforme verificado na Figura 11.

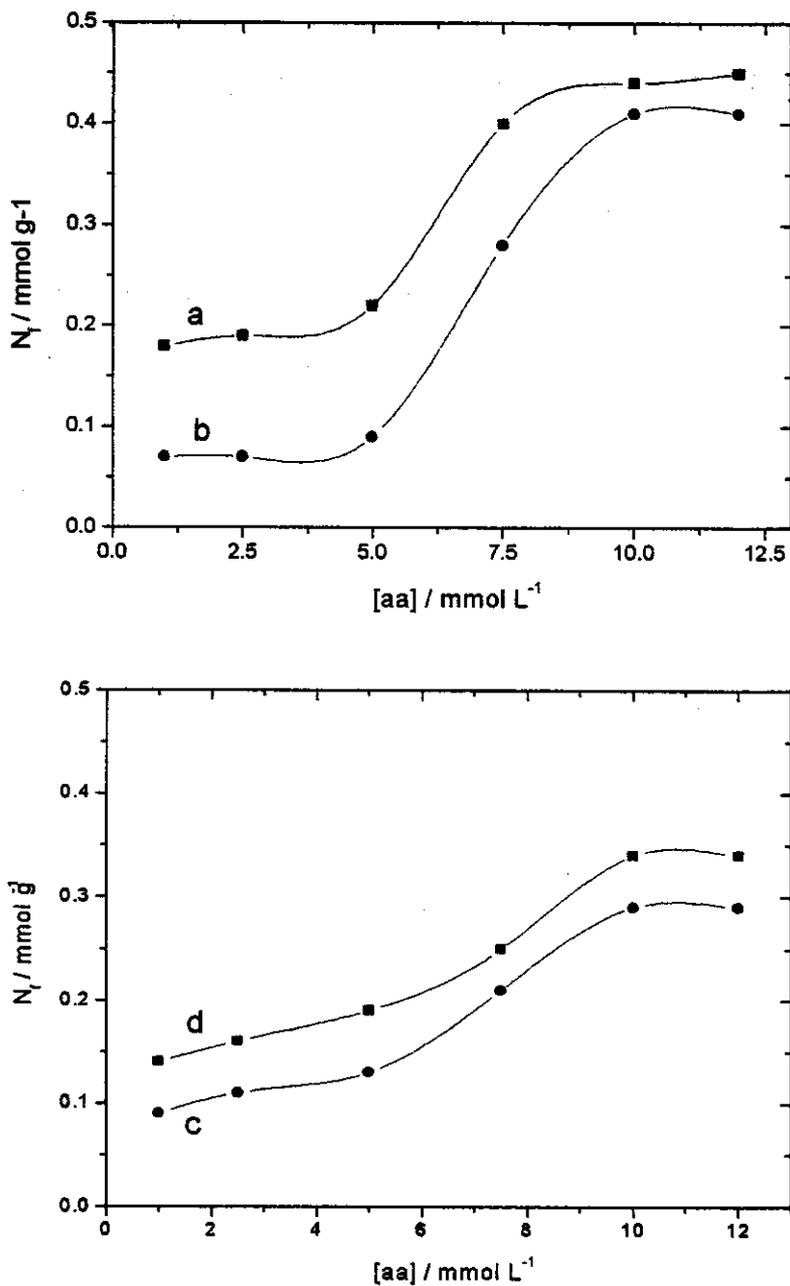


Figura 10. Isothermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SN em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

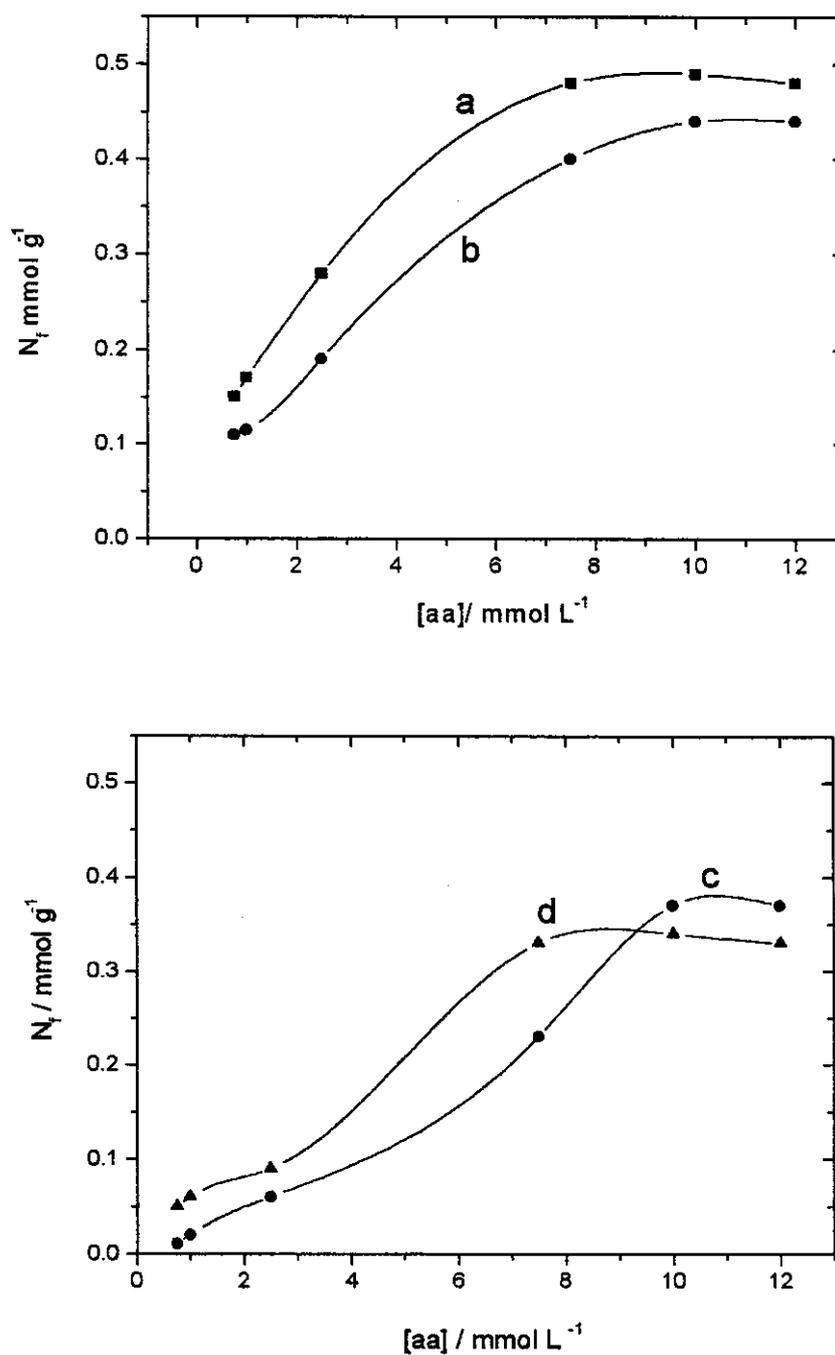


Figura 11. Isotherma de adsorção de amino ácidos pela sílica SZ em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

IV.5.4. Adsorção pela Sílica SZP

Os valores de adsorção desta sílica modificada, Figura 12, retratam muito bem a importância da presença de grupos mais carregados, ou seja, com maior capacidade de interação na superfície da sílica. Essa conclusão foi baseada no fato que a única diferença desta sílica para a SZ é a presença do grupo fosfato, que levou a uma maior adsorção para todos os amino ácidos independente da carga deste. É importante salientar que esta sílica, assim como as sílicas SN e SZ, não obedece ao mecanismo de troca iônica. Também foi confirmada uma tendência de maior adsorção para a glicina e leucina para estas sílicas modificadas com íons metálicos.

IV.5.5. Adsorção pela Sílica Gel

Para uma melhor compreensão dos valores de adsorção das sílicas modificadas, foi verificada a capacidade de adsorção da sílica gel sem modificação. Pelos valores de N_f é possível afirmar, em nível de comparação, que as novas superfícies tornaram-se mais hábeis ao processo de adsorção.

Primeiramente, é importante notar que os valores de adsorção para a glicina e leucina de 0,34 e 0,28 mmol g⁻¹, respectivamente, como visto na Figura 13, não são totalmente desprezíveis, reforçando a hipótese da possibilidade do uso da sílica como matriz cromatográfica. Contudo, há necessidade de melhorar a sua capacidade seletiva, uma vez que o comportamento observado foi muito similar.

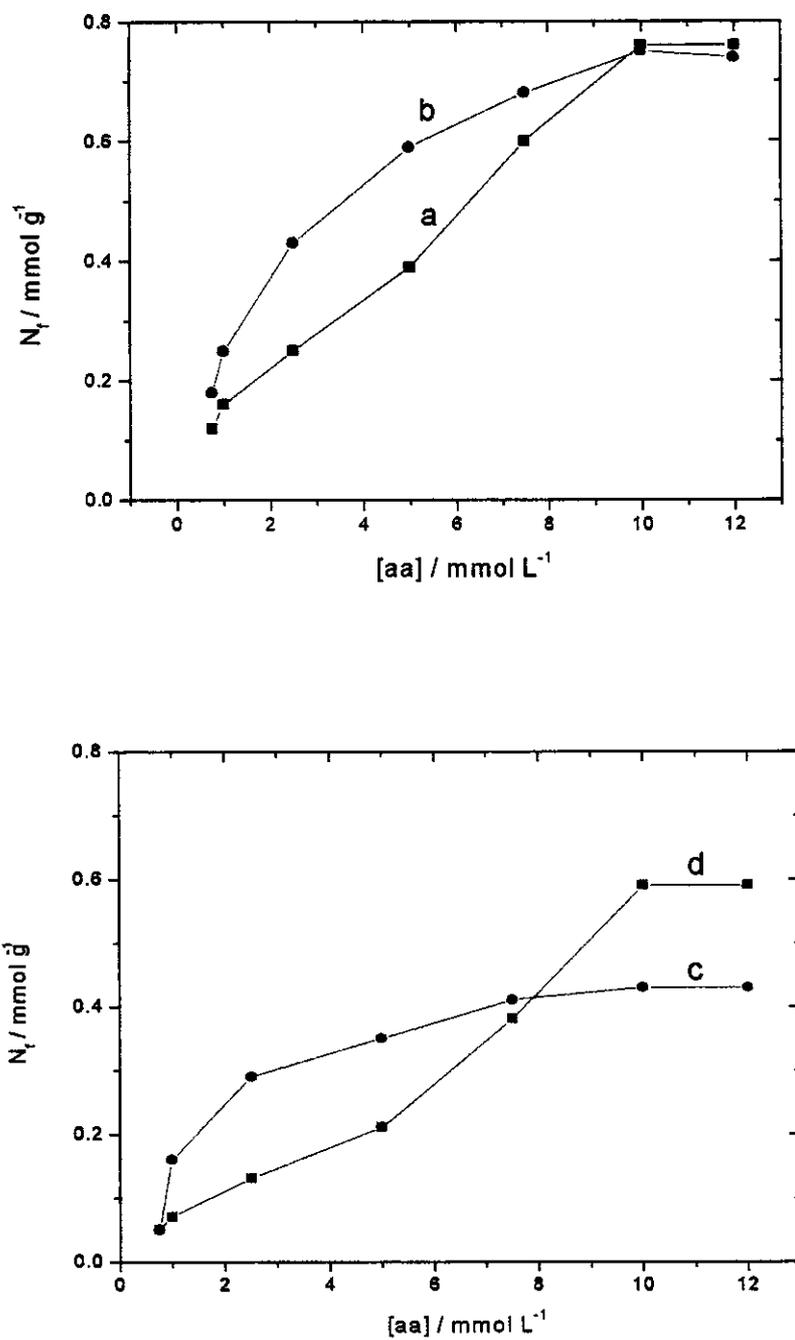


Figura 12. Isothermas de adsorção de amino ácidos pela sílica SZP em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

Já os resultados apresentados para a histidina e lisina 0,14 e 0,13 mmol g⁻¹, na mesma ordem, Figura 13, mostram que a capacidade de adsorção para esses amino ácidos é muito limitada, comprovando também a necessidade de grupos que possam aumentar a capacidade de adsorção de moléculas biológicas, utilizando a sílica como matriz.

Assim, é necessário o desenvolvimento de novas superfícies, a partir da sílica gel, capaz de ampliar ou conservar as propriedades positivas da sílica e corrigir suas limitações. Para tanto, é preciso um maior domínio na área de imobilização de superfície, bem como, maior entendimento nos fenômenos de adsorção sobre a superfície da matriz.

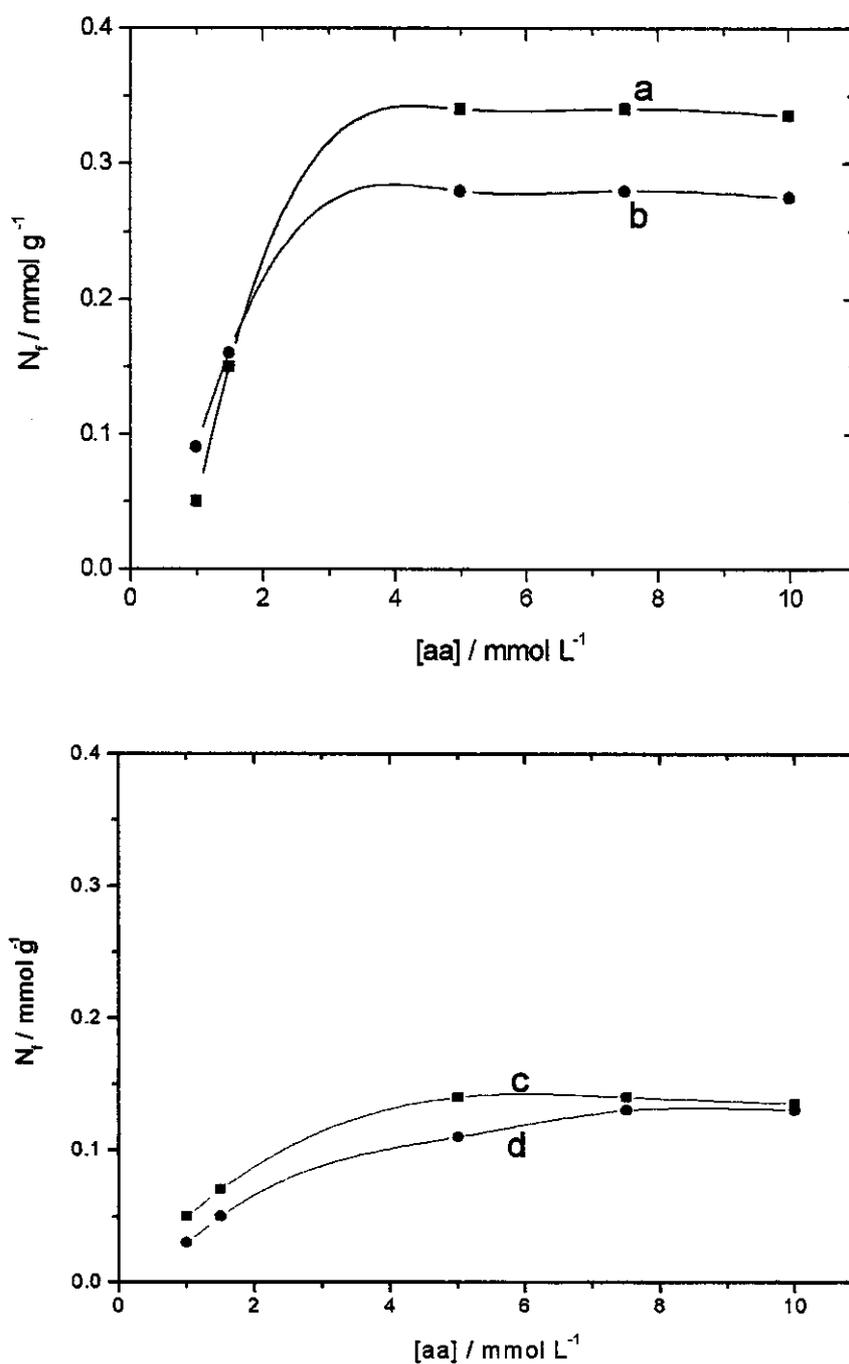


Figura 13. Isotherma de adsorção de amino ácidos pela sílica gel em função da concentração à temperatura de 25°C. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

IV.6. Análise Comparativa das Adsorções da Superfície das Sílicas Modificadas

Tabela 5. Capacidades máximas de adsorção de cada sílica modificada expressa em mmol g⁻¹.

Amino ácido	Sílica SABS	Sílica SN	Sílica SZ	Sílica SZP	Sílica pura
Glicina	1,39	0,45	0,49	0,76	0,34
Leucina	0,54	0,41	0,44	0,75	0,28
Histidina	0,82	0,29	0,37	0,43	0,14
Lisina	0,65	0,34	0,34	0,59	0,13

Foi observada uma maior adsorção da glicina para todas as sílicas modificadas. Isto confirma a ocorrência do processo de invasão, visto que este é o menor e mais simples amino ácido, podendo formar multicamadas.

Foi verificado também, que todas as sílicas apresentaram adsorções consideráveis. No entanto, as sílicas SABS e SZP apresentaram valores bastante superiores, o que poderia ser atribuído à presença do grupo sulfonato e fosfato, respectivamente, os quais podem desenvolver maior afinidade com as moléculas de amino ácidos. Outro aspecto importante a favor destas duas sílicas é a maior diferença de adsorção entre dois amino ácidos, como por exemplo, glicina e leucina para a sílica SABS, podendo evidenciar uma boa seletividade em caso de separação ou purificação. Além disto, foi confirmado que todas as matrizes utilizadas (sílicas modificadas) apresentaram maior capacidade de adsorção, quando comparadas à própria sílica gel. Isto

comprova a eficiência desses grupos para o estudo do comportamento de adsorção de moléculas em matrizes de adsorção.

IV.6.1. Correlação da Adsorção com a Acidez dos Materiais Utilizados

Uma outra possibilidade de avaliar os resultados de adsorção é através da correlação da capacidade de adsorção com a acidez dos óxidos empregados para imobilizar a superfície da sílica.

Numa ordem crescente de acidez tem-se a sílica pura, sem modificação, como a superfície menos ácida, depois, com acidez muito próxima, as sílicas com óxidos de zircônio (SZ) e óxido de nióbio (SN) e a superfície mais ácida, a sílica com fosfato de zircônio (SZP).

Por meio desta ótica é possível afirmar que o aumento da acidez da superfície da sílica com a modificação de sua superfície, melhora a capacidade de adsorção, como pode ser observado na Tabela 5.

Certamente não é apenas a acidez do grupo que importa, pois não basta uma alta capacidade de adsorção é necessário uma alta seletividade para que estes materiais possam ser utilizados em processos de separação cromatográfica.

É importante notar que o aumento na acidez da superfície da sílica não melhorou a caráter seletivo da superfície da mesma, tendo em vista o comportamento similar das adsorções dos amino ácidos nas Figuras 10 a 13. Por isso, não basta apenas o aumento da acidez da superfície da matriz, é necessário que o grupo selecionado a ser imobilizado, na superfície desta, possa conciliar vários outros fatores na busca de seletividade.

IV.7. Comportamento de Adsorção das Sílicas Modificadas em Função do pH.

Os principais compostos bioquímicos que são providos de carga num dado valor de pH, podem ser separados com o auxílio da troca-iônica. Em geral, o equilíbrio ácido-base que é estabelecido pode ser representado pelas equações (13) e (14) apresentadas no item (I.7.1).

O grau de retenção do soluto pode ser controlado pelo pH do meio conforme mencionado anteriormente. Em pH baixo (alta concentração de H_3O^+) o equilíbrio da reação (13) é deslocado para a esquerda e somente uma baixa concentração de A^- competirá pelos sítios de troca de ânions. De maneira similar, em pH alto, diminui a concentração de H_3O^+ , deslocando o equilíbrio da reação (14) para a esquerda.

O efeito do pH na retenção de amino ácidos básicos tem sido demonstrado, sob condições extremas de pH, quando todas as moléculas estão totalmente carregadas. Para um composto ácido, a retenção é aproximadamente proporcional a $1/[H^+]$. Para exemplificar, a Tabela 6 lista alguns dados para um ácido de $pK_a = 5$.

Tabela 6. Relação entre a retenção de um composto ácido e o pH da solução.

pH	Retenção
3	0,01
4	0,09
5	0,5
6	0,91

Isso mostra que, quando o pH é exatamente igual ao valor do pK_a , a metade das moléculas estão dissociadas, e na equação (13) a concentração de HA é igual a concentração de A^- , podendo ser mostrado como se segue:

$$pH = pK_a + \log ([A^-] / [HA]) \quad (\text{eq. 23})$$

A relação inversa pode ser mostrada para álcalis em coluna de troca de cátions.

Com isto, conclui-se que o pH pode ser usado com grande eficiência para alterar a seletividade do sistema cromatográfico para vários solutos.

IV.7.1. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SABS

A Figura 14 mostra o comportamento de adsorção da sílica gel SABS frente às soluções de glicina e leucina em diferentes pH (1 a 6). A adsorção máxima dos dois amino ácidos mostrou-se bastante significativa, em pH 3,0 e pH 4,0 para os dois amino ácidos respectivos. No entanto, o comportamento de adsorção é bastante diferenciado. Em pH ao redor de 1,0 os valores de adsorção são bastante diferentes, onde, provavelmente, a glicina assume forma mais positiva que o outro amino ácido. Com isto, torna-se capaz de desenvolver uma atração eletrostática mais efetiva com a matriz, que pode continuar atraindo novas moléculas de glicina, fato que não se observou com a leucina (amino ácido mais hidrofóbico de todos os utilizados).

Em pH próximo a 2,5 seria esperada uma capacidade de adsorção similar para estes amino ácidos, considerando os seus valores de pK_1 (α -COOH) 2,34 e 2,36 para a glicina e a leucina, respectivamente. No entanto, este

comportamento não foi observado, ocorrendo uma grande diferença de adsorção entre eles. Isto sugere que o processo de adsorção não é regido apenas pela atração eletrostática da troca-iônica, certamente ocorrem outros tipos de interações mais específicas capazes de proporcionar tal diferença.

Em pH próximo de 4, foi obtido um grande ganho de adsorção para a leucina, produzindo um máximo bem definido de adsorção, fato importante, pois evidencia a afinidade da sílica pelo amino ácido, bem como um possível controle desta afinidade através do pH, essencial quando em condições reais de purificação e separação.

Na seqüência das adsorções da sílica SABS tem-se, na Figura 14, os máximos para a histidina e lisina em pH 2,0 e pH 1,0, respectivamente. Com estes amino ácidos de características químicas semelhantes (grupo R polar carregado positivamente, no pH de trabalho), suas adsorções são maiores para pH menores e decaem à medida que o pH aumenta. No entanto, a histidina com pK_r (pK da cadeia lateral, particular de cada amino ácido) de 6,0 responde muito mais ao aumento do pH do que a lisina com pK_r de 10,53.

Considerando os dados apresentados na Figura 14, foi possível concluir que há um compromisso entre a afinidade do amino ácido frente à superfície da sílica, associado às interações eletrostáticas entre essas moléculas e os grupos imobilizados. É importante notar que, para essa sílica, a quantidade de soluto adsorvido é superior à quantidade de grupos imobilizados em sua superfície, provavelmente devido à retenção de amino ácidos em pequenos poros e também, um pouco, por parte da adsorção dos grupos silanóis remanescentes.

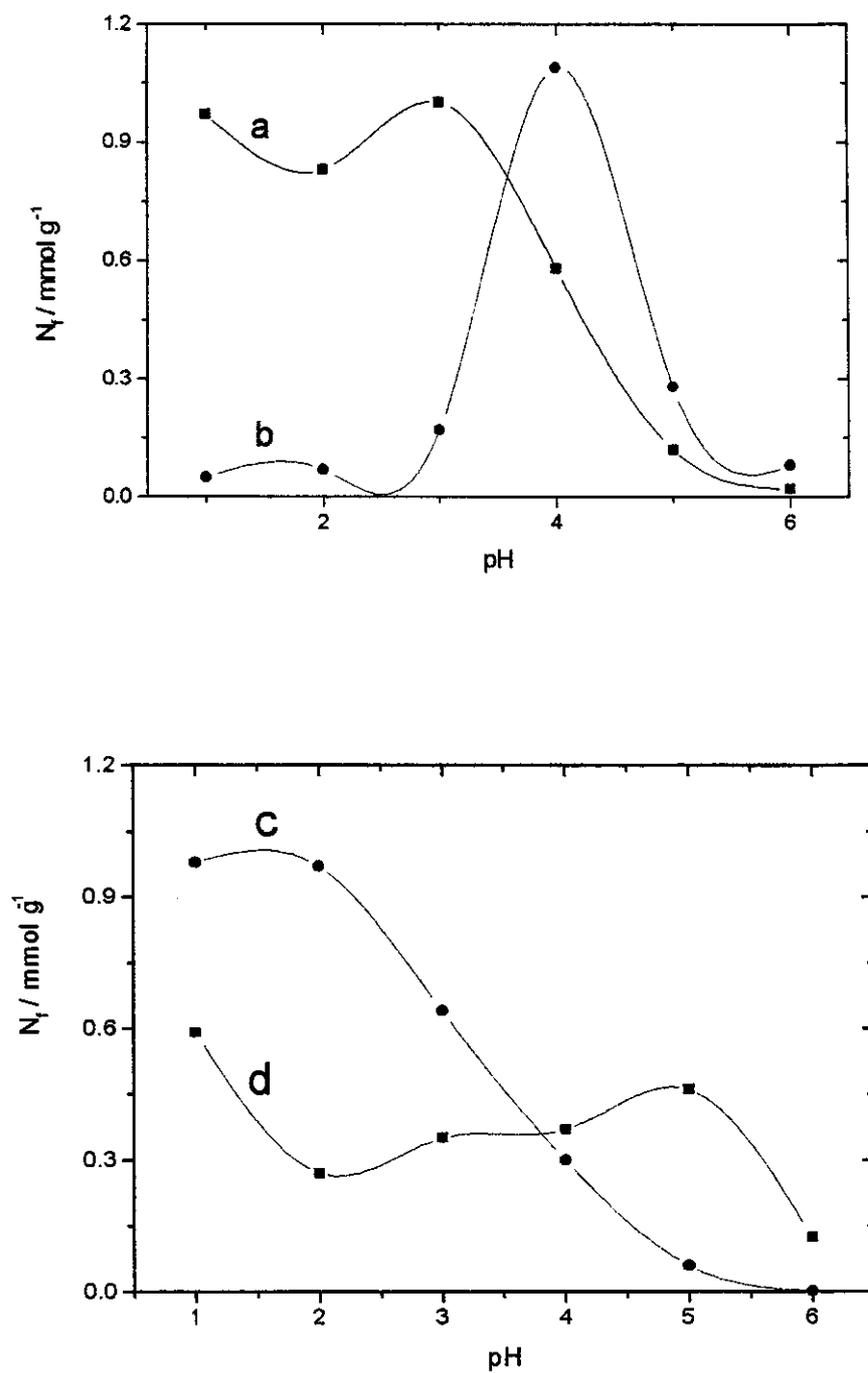


Figura 14. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SABS. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

IV.7.2. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SN

A sílica nióbio (SN) apresenta um comportamento de adsorção bem definido para todos os amino ácidos mostrando pouca diferença entre si, conforme ilustrado na Figura 15.

Embora as adsorções tenham sido significativas, todas ficaram limitadas a valores de pH próximos de 1,0. Ao contrário do apresentado anteriormente para a sílica SABS, a glicina foi menos adsorvida que a leucina (0,44 e 0,61 mmol g⁻¹, respectivamente, ambas em pH 1,0). Com isto, foi comprovado que o simples fato da superfície ser de troca catiônica não assegura o mesmo comportamento de adsorção, quando se trata de biomoléculas.

Ainda na Figura 15 foram apresentadas as adsorções máximas da histidina (0,67 mmol g⁻¹) e lisina (0,49 mmol g⁻¹), também ambas em pH 1,0. Foi observado o mesmo comportamento de adsorção que para os outros amino ácidos, isto é, alta em pH ao redor de 1,0, com redução à medida que o pH do meio aumenta. Com a avaliação desta sílica foi possível notar que não é condição suficiente o grupo desenvolver boa adsorção, havendo necessidade de apresentar alguma seletividade. Certamente a presença do $\equiv\text{NbOH}$ consegue desenvolver a atração eletrostática, mas pouca afinidade com os amino ácidos, havendo uma dependência muito grande do valor baixo de pH para promover boa adsorção. Com isto, é possível comprovar que os grupos sulfonatos da sílica SABS são melhores e mais versáteis para o estudo da adsorção dessas biomoléculas.

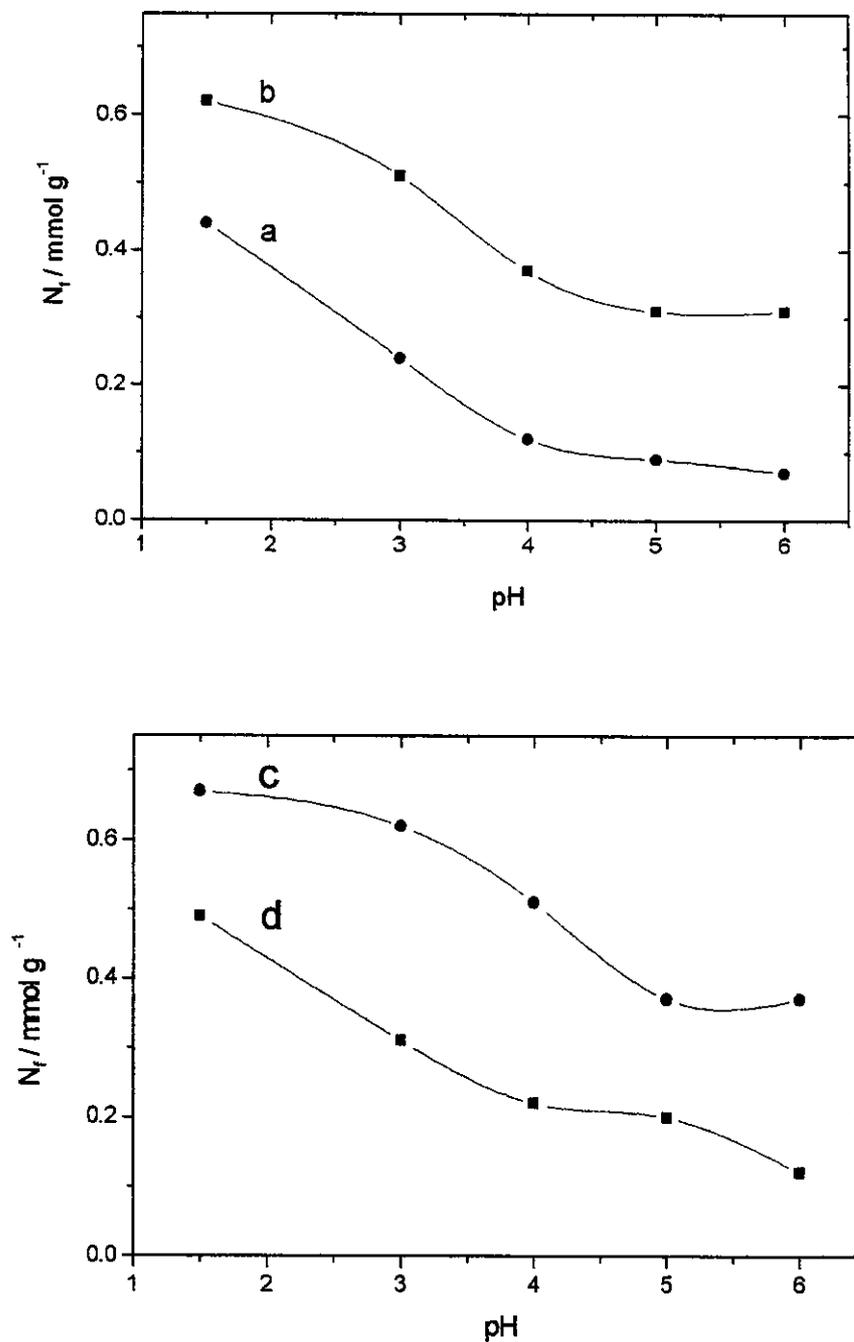


Figura 15. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SN. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

Em comparação ao experimento realizado sem o controle do pH, como pode ser visto na Figura 10, a sílica SN responde de forma diferenciada. No entanto, as novas curvas continuam apresentando pouca capacidade de diferenciar os amino ácidos. Isto demonstra que é necessário que os grupos imobilizados sejam capazes de explorar também a especificidade dessas espécies.

IV.7.3. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SZ

Para esta sílica foi possível verificar um caráter mais seletivo de adsorção frente ao controle do pH. No entanto, ela apresentou a desvantagem de adsorver menos que as demais sílicas avaliadas. A Figura 16 apresenta as adsorções máximas para a glicina (0,27 mmol g⁻¹ em pH 6,0) e leucina (0,42 mmol g⁻¹ em pH 5,0). Assim como observado para a sílica SN, a glicina não é o amino ácido com maior adsorção. Ainda com relação à sílica SN, o comportamento de adsorção da SZ é bem melhor, pois é possível verificar máximos de adsorção em pH 5,0 e 6,0.

Esse comportamento evidencia uma maior seletividade dos grupos $\equiv\text{ZrOH}$ em relação a SN, comprovando que a sílica com zircônio (maior caráter anfotérico) consegue distinguir melhor as moléculas de amino ácidos. No entanto, as quantidades de analitos adsorvidos por esta sílica modificada são muito pequenas em relação às outras e, como se sabe, é importante que a sílica modificada possa conciliar alta adsorção com capacidade de distinguir as moléculas.

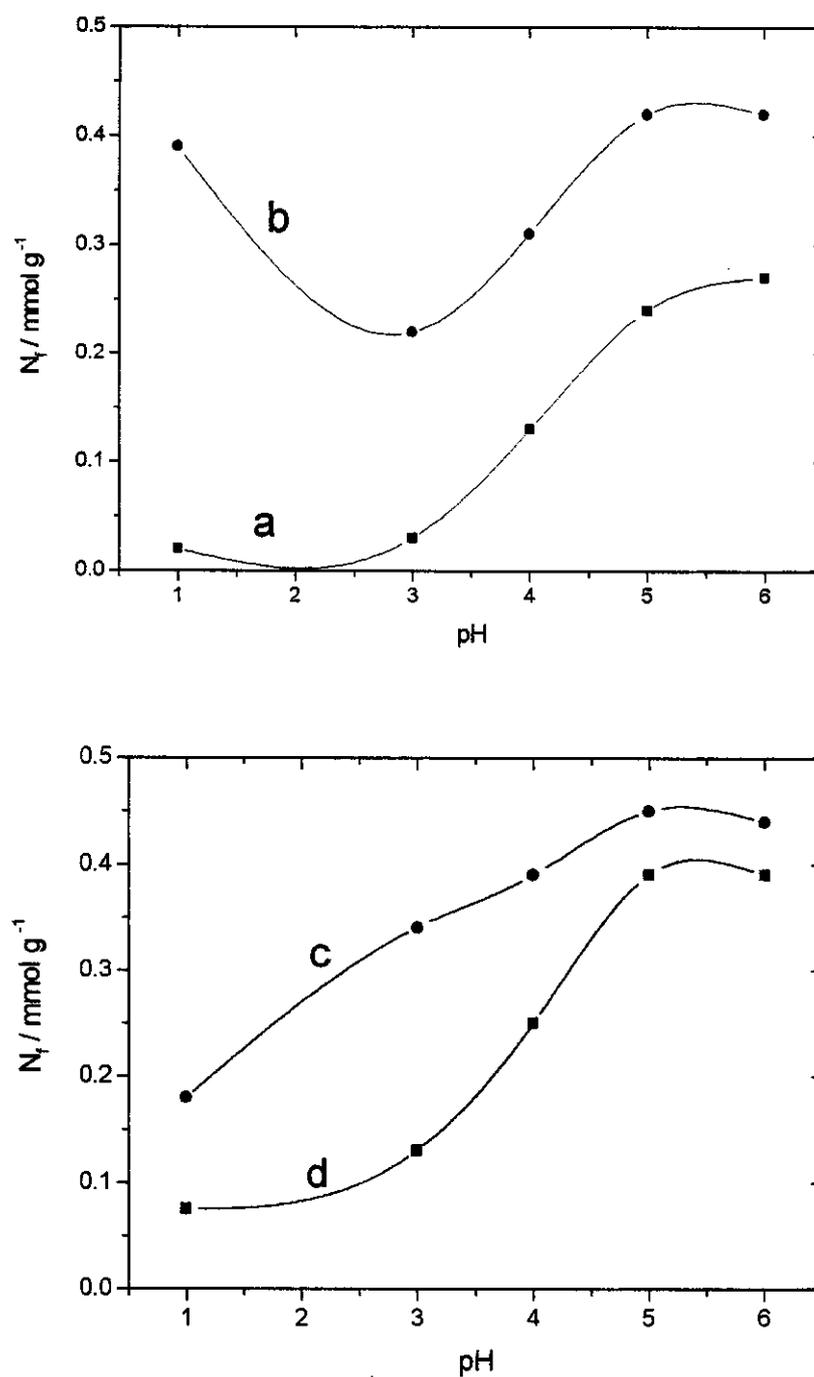


Figura 16. Curvas de adsorção dos amino ácidos em função do pH, usando-se a sílica SZ. Glicina (a); leucina (b) histidina (c) e lisina (d).

Assim, com suas características ácidas mais moderadas, provavelmente, não consegue desenvolver uma atração eletrostática grande. É provável que a imobilização de um grupo capaz de superar essa deficiência de adsorção, associado ao caráter mais seletivo apresentado pela SZ, poderia fornecer resultados mais significativos. Desta forma, foi feita a modificação da superfície da sílica, mantendo o zircônio e adicionando um grupo mais ácido, no caso, ácido fosfórico.

IV.7.4. Influência do pH na Adsorção dos Amino Ácidos pela Sílica SZP

A sílica SZP apresenta características semelhantes de adsorção dos amino ácidos, variando o pH em que ocorrem as adsorções máximas. Todas as curvas (Figura 17) evidenciam dois máximos de adsorção, sendo um em pH bastante baixo, próximo de 1,0 e outro mais alto entre 3,0 e 5,0. As adsorções máximas para a glicina, leucina, histidina e lisina, correspondem a valores de 1,18; 1,12; 0,72 e 1,11 mmol g⁻¹ e valores de pH 5,0; 4,5; 4,5 e 3,5 respectivamente.

Para o primeiro máximo de adsorção, no qual a quantidade de carga positiva é bastante elevada, poderia haver a possibilidade de ocorrer adsorção em multicamadas dos amino ácidos. O processo consiste na adsorção de uma camada destas espécies, a qual, por sua vez, atrai outros amino ácidos presentes em solução, já que as moléculas destes se encontram com carga.

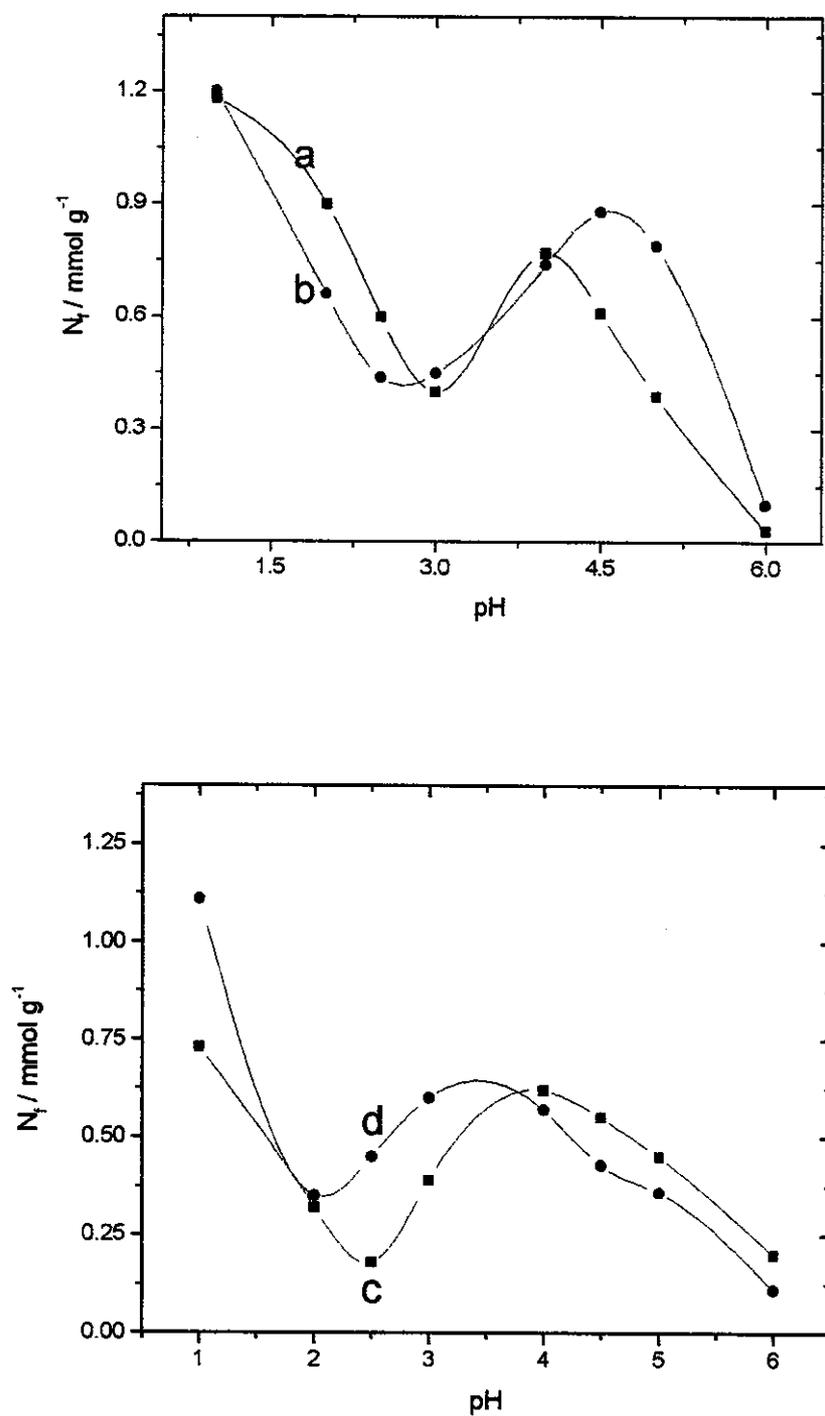


Figura 17. Curvas de adsorção de amino ácidos em função do pH, usando-se sílica SZP. Glicina (a); leucina (b); histidina (c) e lisina (d).

No segundo máximo de adsorção, foi possível verificar que a presença dos grupos R, polares e carregados positivamente, da histidina e lisina não melhorou a capacidade de adsorção desses amino ácidos. Isto comprova que a presença do grupo fosfato melhorou a adsorção dos amino ácidos, não puramente pelo processo da troca iônica, mas sim, por outros tipos de interações predominantes.

Essas características de adsorção da sílica SZP, comparada à sílica SZ, são muito importantes, pois a única diferença entre elas é a presença de grupos terminais. Com isto, fica evidente a necessidade de aprofundar os conhecimentos com relação aos mecanismos envolvidos na adsorção das biomoléculas, que poderá levar a uma elevada seletividade pela simples mudança no grupo terminal da matriz imobilizada.

IV.7.5. Análise Comparativa das Sílicas Modificadas

Através dos dados listados na Tabela 7, é possível comparar o desempenho das sílicas modificadas. Primeiramente, foi constatado, em muitos casos, que ocorreu adsorção diferenciada, à medida que é alterado o pH da solução.

Para a sílica modificada com grupos aminopropil-benzenossulfonato (SABS), existe a possibilidade de separação dos amino ácidos, como, por exemplo, na mistura de leucina com histidina, mostrando a viabilidade da imobilização da sílica e a continuidade nos estudos para o entendimento das interações que regem este tipo de adsorção.

Tabela 7. Valores de adsorção máxima dos amino ácidos para cada sílica modificada (N_f em mmol g^{-1}), com o respectivo valor de pH da adsorção máxima.

	Glicina	Leucina	Lisina	Histidina
SABS	1,08 (pH 3,0)	1,09 (pH 4,0)	0,60 (pH 1,0)	0,98 (pH 2,0)
SN	0,44 (pH 1,0)	0,61 (pH 1,0)	0,49 (pH 1,0)	0,67 (pH 1,0)
SZ	0,27 (pH 6,0)	0,42 (pH 5,0)	0,39 (pH 3,0)	0,45 (pH 5,0)
SZP	1,18 (pH 5,0)	1,12 (pH 4,5)	1,11 (pH 3,5)	0,72 (pH 4,5)

Já a sílica modificada com óxido de nióbio (SN), cujo comportamento não foi similar às demais, foi verificado que a superfície desta sílica não apresentou afinidade diferenciada pelos amino ácidos escolhidos, razão pela qual não consegue diferenciá-los.

Por sua vez, a sílica modificada com óxido de zircônio (SZ), embora apresentasse menor capacidade de adsorção que as demais, foi capaz de adsorver os amino ácidos de forma diferenciada, sugerindo que através de alguma mudança em sua superfície poderia fornecer bons resultados.

O estudo da sílica quimicamente modificada com grupos fosfato de zircônio (SZP) comprovou que superfícies semelhantes podem apresentar resultados bem diferentes, quando se trata de moléculas biológicas, pois esta apresenta, boa adsorção e máximos bem definidos com o controle do pH.

Outro fato que não deixa dúvida é a importância dos grupos sulfonatos na sílica SABS e fosfatos na Sílica SZP. Eles apresentam peculiaridades tanto com relação à capacidade de adsorção, quanto com a afinidade desenvolvida com os amino ácidos, já que conforme foi observado, a simples troca-iônica

não explica totalmente o comportamento de adsorção destas sílicas modificadas.

IV.8. Experimento em Coluna para Verificar o Comportamento de Adsorção de Misturas Binárias dos Amino Ácidos

A análise isolada deste experimento visa ao conhecimento da capacidade diferenciada de adsorção dos amino ácidos em condições mais reais de uso. Considerando as isotermas de adsorção apresentadas para as diferentes sílicas modificadas, pode-se concluir que a SABS e a SZP apresentaram maiores capacidades de adsorção bem como maior seletividade, controlando o pH do meio, motivo pelo qual foram selecionadas para este experimento.

IV.8.1. Resultados para a Sílica SABS

Para esta sílica foi possível comprovar que as adsorções permaneceram altas, evidenciando que as interações destas moléculas são fortes e de rápida adsorção; isso porque não decaiu a quantidade de amino ácido adsorvido quando submetida a condições na coluna, e mesmo com o uso de pequenas quantidades de sílica modificada (0,7 g), foi possível verificar alguma capacidade de separação.

Para uma melhor visualização e compreensão dos resultados obtidos, foi calculado o fator de separação F_s entre a mistura dos dois amino ácidos para cada pH. Para o cálculo deste fator, foi feita a relação entre a adsorção da glicina A_G e a adsorção do outro amino ácido da mistura binária A_A , como visto na equação 24. Estes valores são apresentados na Tabela 8.

$$F_s = A_G / A_A \quad (\text{eq. 24})$$

A Figura 18 mostra que a adsorção da glicina diminuiu à medida que aumentou o pH, o que pode ser atribuído a força de suas interações, que decai comparada a outro amino ácido. A leucina apresentou um máximo de adsorção em pH 4,0 que é distante de seu pK mais próximo, sugerindo que neste ponto o caráter da afinidade deve superar o processo de troca iônica. Já a lisina e a histidina aumentaram suas adsorções à medida que o pH do meio foi aumentado. Neste sentido, mais uma vez foi comprovado que o fator eletrostático também é muito importante, pois a adsorção cresceu proporcionalmente ao pH.

Por último, é importante salientar que através deste experimento para a sílica SABS foi possível verificar os seguintes fatos: (a) eficiente cinética de adsorção da superfície; (b) existência de força de atração desta superfície frente aos amino ácidos e (c) existência de um compromisso de adsorção entre a atração eletrostática entre as moléculas e a presença de afinidades mais específicas.

Tabela 8. Valores referentes ao fator de separação entre as misturas binárias de amino ácidos. Experimento em coluna para a sílica SABS e análise por HPLC.

mistura de amino ácidos	pH 1,5	pH 3	pH 4	pH 5
Gly / lys	1,14	0,88	0,77	0,82
Gly / leu	1,20	1,33	0,72	0,64
Gly / his	0,85	1,75	1,12	0,69

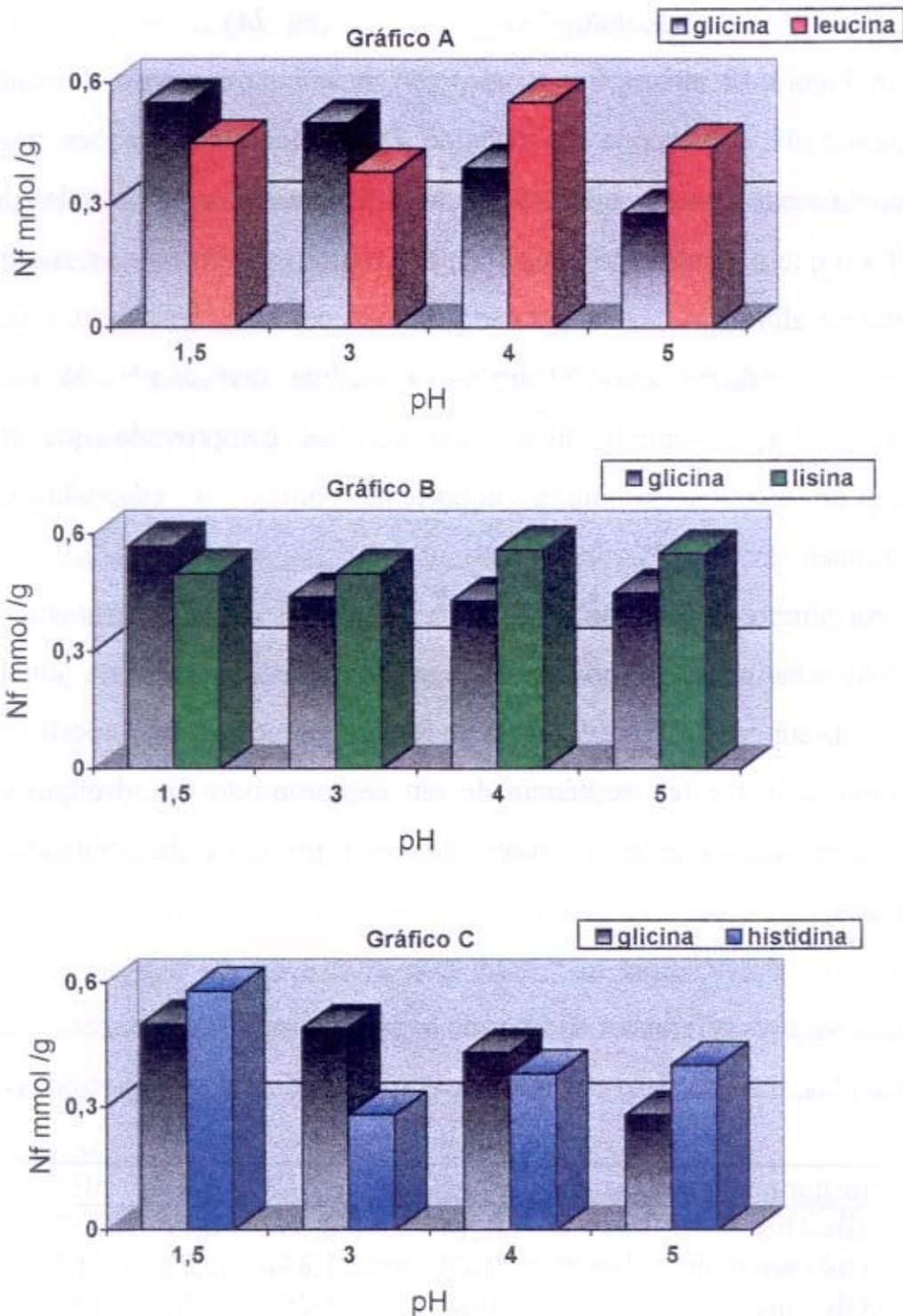


Figura 18. Adsorção comparativa (mmol g^{-1}) referente à percolação da mistura de glicina/leucina (gráfico A); glicina/lisina (gráfico B) e glicina/histidina (gráfico C). Experimento em coluna para a sílica SABS.

Os dados da Tabela 8 comprovam a diferença de adsorção dos amino ácidos das misturas estudadas. Pode-se notar para alguns casos (glicina/leucina pH 5,0) que houve uma diferença razoável de comportamento entres esses dois amino ácidos, reforçando o fato de que as investigações nesta direção poderão trazer resultados bem significativos, tanto no entendimento dos mecanismos de adsorção como na descoberta de matrizes modificadas capazes de separar seletivamente biomoléculas.

IV.8.2. Resultados para a Sílica SZP

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19, em geral a adsorção aumentou proporcionalmente com o pH. Embora tenham sido observados valores elevados de adsorção, não foi verificado seletividade a ponto de promover a separação dos amino ácidos presentes na mistura. O melhor resultado foi observado para a mistura do par glicina/leucina em pH 3,0 com fator de separação de 1,47, conforme se pode verificar na Tabela 9.

Tabela 9. Valores referentes ao fator de separação entre as misturas binárias de amino ácidos. Experimento em coluna para a sílica SZP e análise por HPLC.

mistura de amino ácido	pH 1,5	pH 3	pH 4	pH 5
Gly / lys	0,84	1,11	0,79	-
Gly / leu	0,90	1,47	1,33	1,22
Gly / his	0,89	0,85	0,98	0,92

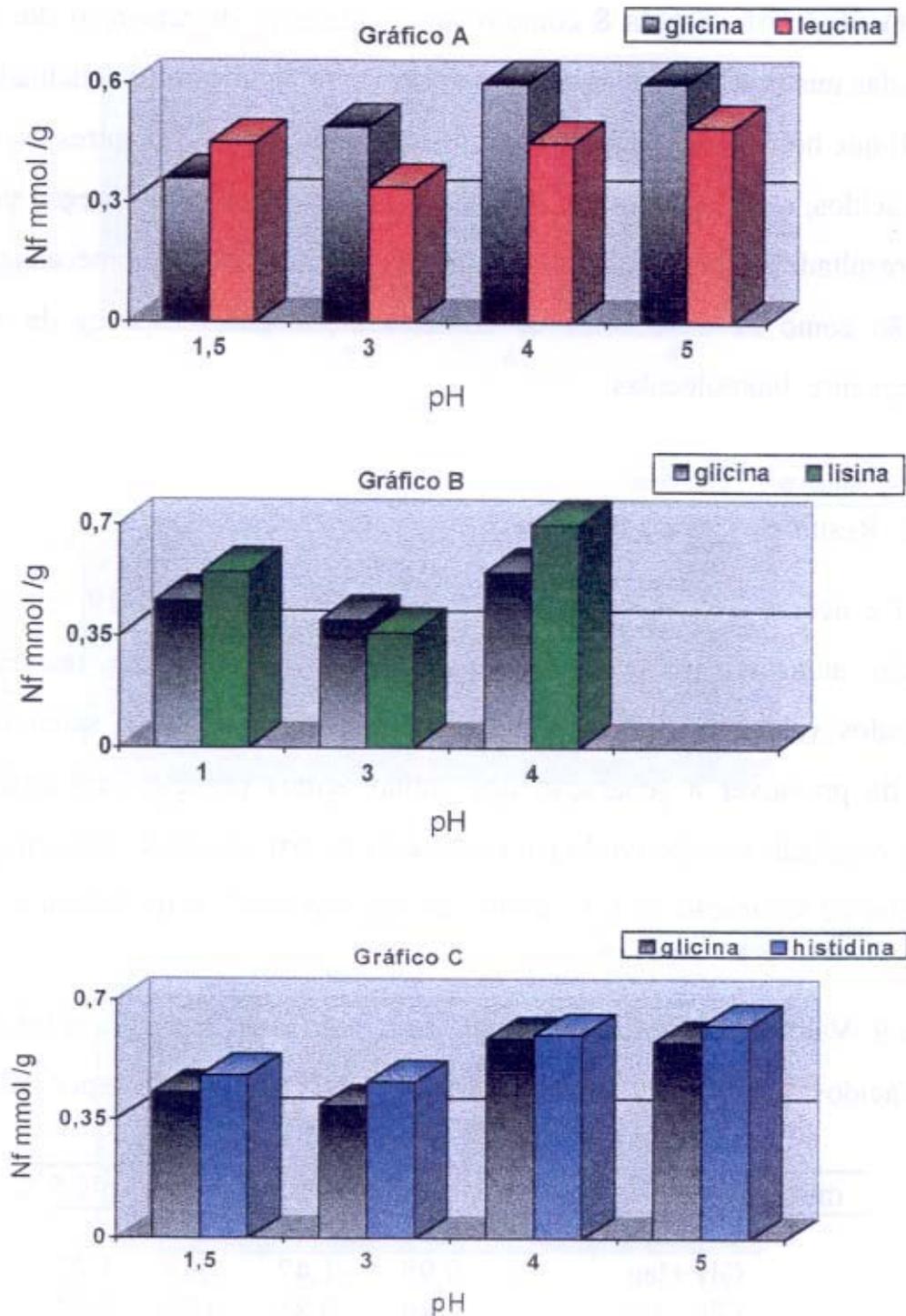


Figura 19. Adsorção comparativa (mmol g^{-1}) referente à percolação da mistura de glicina/leucina (gráfico A); glicina/lisina (gráfico B) e glicina/histidina (gráfico C). Experimento em coluna para a sílica SZP.

IV.8.3. Análise Comparativa da Adsorção em Coluna

Na análise comparativa entre essas duas sílicas, é possível afirmar que a sílica SABS possui melhores características de adsorção frente aos amino ácidos, pois além de apresentar maior diferença de adsorção entre aqueles estudados, responde com maior eficiência em termos do pH, embora as duas sílicas tenham apresentado grande capacidade de adsorção. Outro aspecto importante é que, desconsiderando a adsorção em pH muito baixo, a sílica SZP apresenta o comportamento mais regular com a variação do pH, ou aumenta a adsorção ou diminui; já a sílica SABS evidencia um caráter mais seletivo. Este caráter pode estar associado a uma afinidade frente aos amino ácidos.

V. CONCLUSÕES

A modificação da superfície da sílica pode ser muito útil no desenvolvimento de matrizes com caráter seletivo, podendo levar à separação e purificação de compostos biológicos. A adsorção de amino ácidos em superfície de sólidos proporciona informações importantes a respeito das interações das espécies carregadas e a superfície modificada. As interações dependem da carga e da afinidade das espécies com a superfície.

Um fator importante apresentado por estas sílicas modificadas foi a resposta diferenciada, quando submetidas ao controle do pH do meio, melhorando sensivelmente o caráter seletivo das adsorções dos amino ácidos, sem perda na capacidade de adsorver tais moléculas.

Outro aspecto importante diz respeito à estabilidade da sílica e os grupos de troca suportados nesta, podendo ser muito importantes para uso em separação e purificação de amino ácidos, proteínas e moléculas correlatas.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos foram bastante significativos e animadores para o prosseguimento dos estudos nesta área, não apenas no desenvolvimento de novas sílicas modificadas, mas também, no estudo calorimétrico das interações envolvidas na superfície da sílica. Esse tipo de conhecimento é de muita importância para se entender melhor os fenômenos químicos que regem as adsorções na superfície destas matrizes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Scopes, R. K; "Protein Purification: Principles and Practices", Springer-Verlag, New York (1982).

[2] Gaida A. V.; Staroverov S. M.; **Modified Silica Supports in Biotechnology**; *Mendeleev Chem. J.*, 34(3) (1989) 100-109.

[3] Ohta, K.; Tanaka, K. T. and Haddad, P. R.; **Ion-Exclusion Chromatography of Benzenecarboxylic Acids on an Unmodified Silica-Gel Column**; *J. Chromatogr. A*, 782 (1997) 33-40.

[4] Fang, F.; Aguilar, M. I. and Hearn, M. T. W.; **Influence of Temperature on the Retention Behaviour of Proteins in Cation-Exchange Chromatography**; *J. Chromatogr. A*, 729 (1996) 49-66.

[5] Lee, W. C.; Chuang, C. Y.; **Performance of pH Elution in High-Performance Affinity Chromatography of Proteins Using Non-Porous Silica**; *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 31-39.

[6] Haupt, K.; Bueno, S. M. A .and Vijayalakshmi, M. A.; **Interaction of Human Immunoglobulin G with L-Histidine Immobilized onto Poly(Ethylene Vinyl Alcohol) Hollow-Fiber Membranes**; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, 674 (1995) 13-21.

- [7] Lopatin, S. A.; Varlamov, V. P.; **New Trends in Immobilized Metal Affinity Chromatography of Proteins**; *Appl. Biochem. Microbiol.*, **31**(3) (1995) 221-227.
- [8] Kytökivi, A.; LaKomaa, E. L. and Root, A.; **Controlled Formation of ZrO₂ in the Reaction of ZrCl₄ Vapor with Porous Silica and γ -Alumina Surfaces**; *Langmuir*, **12** (1996) 4395-4403.
- [9] Denofre, S.; Gushikem, Y.; Castro, S. C. and Kawano, Y.; **Stability and Surface Acidity of Niobium (V) Oxide Grafted on a Silica Gel Surface**; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**(7) (1993) 1057-1061.
- [10] Denofre, S.; Gushikem Y. and Davanzo, C. U.; **Adsorption Property of Nb (V) Oxide Grafted on Silica Gel Surface**; *Eur. J. Solid. State Inorg. Chem.*, **28** (1991) 1295-1305.
- [11] Nagata, N.; Kubota, L. T.; Bueno, M. I. M. S. and Peralta-Zamora, P. G.; **Adsorption Parameters of Cd (II), Pb (II) and Hg (II) on Zirconium (IV) Phosphate Chemically Grafted on to Silica Gel Surface**; *J. Colloid Interface Sci.*, **200** (1998) 121-125.
- [12] Kurganov, A.; Trüdinger, U.; Isaeva, T. and Unger, K.; **Native and Modified Alumina, Titania and Zirconia in Normal and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography**; *Chromatographia*, **42** (3/4) (1996) 217.

- [13] Willie, S. N.; Sturgeon, R. E. and Berman, S. S.; **Comparison of 8-Quinololinol-Bonded Polymer Supports for the Preconcentration of Trace Metals from Sea Water**; *Anal. Chim. Acta*, **149** (1983) 59-63.
- [14] Kempe, M.; Mosbach, K.; **Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins on Molecularly Imprinted Stationary Phases**; *J. Chromatogr. A*, **691** (1995) 317-323.
- [15] Volkam, M.; Ataman, Y. and Howard, A. G.; **Pre-Concentration of some Trace Metals from Sea Water on a Mercapto-modified Silica Gel**; *Analyst*, **112** (1987) 1409-1412.
- [16] Iomamoto, M. S.; Gushikem, Y.; **Adsorption and Pre-Concentration of some Metal Ions from Ethanol on Silica Gel Modified with Pyridinium Ion**; *Analyst*, **114** (1989) 983-985.
- [17] Dias Filho, N. L.; Gushikem, Y.; Polito, W. L.; Moreira, J. C. and Ehirim, E. O.; **Sorption and Preconcentration of Metal Ions in Ethanol Solution with a Silica Gel Surface Chemically Modified with Benzimidazole**; *Talanta*, **42** (1995) 1625-1630.
- [18] Lessi, P.; Dias Filho, N. L.; Moreira, J. C. and Campos, J. T. S.; **Sorption and Preconcentration of Metal Ions on Silica Gel Modified with 2,5-Dimercapto-1,3,4-Thiadiazole**; *Anal. Chim. Acta*, **327** (1996) 183-190.

- [19] Clausen, A. M.; Carr, P. W.; **Chromatographic Characterization of Phosphonate Analog EDTA-Modified Zirconia Support for Biochromatographic Applications**; *Anal. Chem.*, **70** (1998) 378-385.
- [20] Hill, S. G.; Seddon, D., **Comparison of the Sorption of Benzene in ZSM-5, Silicalite-1, and Silicalite-2**; *Zeolites*, **11** (1991) 699-704.
- [21] Khvoshchev, S. S.; Zverev, A. V.; **Calorimetric Study of NH₃ and CO₂ Adsorption on Erionites and Zeolites L**; *Thermochim. Acta*, **164** (1990) 315-322.
- [22] McCalley, D. V.; **Comparative Evaluation of Bonded-Silica Reversed-Phase Columns for High-performance Liquid Chromatography Using Strongly Basic Compounds and Alternative Organic Modifiers Buffered at Acid pH**; *J. Chromatogr. A*, **769** (1997) 169-178.
- [23] Jedrzejewski, P. T.; Taylor, L. T.; **Comparison of Silica-, Alumina-, and Polymer-Based Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography**; *J. Chromatogr. Sci.*, **33** (1995) 438-443.
- [24] Marshall, M. A.; Mottola, H. A.; **Effect of Pore Size on the Capacity of Silica-Immobilized 8-Quinolinol**; *Anal. Chim. Acta*, **158** (1984) 369-373.
- [25] Iler, R. K. "The Chemistry of silica", John Wiley & Sons, New York (1979).

[26] Churms, S. C.; **Recent Progress in Carbohydrate Separation by High-Performance Liquid Chromatography Based on Hydrophilic Interaction;** *J. Chromatogr. A*, **720** (1996) 75-91.

[27] Azerede, L. C.; Azeredo, M. A. A.; **Utilização da 8-Hidroxiquinolina em Técnica de Pré-Concentração de Íons Metálicos em Colunas;** *Química Nova* **19**(4) (1996) 383-387.

[28] Björklund, M.; Hearn, M. T. W.; **Synthesis of Silica-Based Heparin-Affinity Adsorbents;** *J. Chromatogr. A*, **728** (1996) 149-169.

[29]Engelhardt, H.; Mathes, D.; **High-Performance Liquid Chromatography of Proteins Using Chemically-Modified Silica Support;** *Chromatographia*, **14** (6) (1981) 325-332.

[30] Croe, K.; McCarthy, P. T. and Flanagan, R. J.; **HPLC of Basic Drugs and Quaternary Ammonium Compounds on Microparticulate Strong Cation-Exchange Materials Using Methanolic or Aqueous Methanol Eluents Containing an Ionic Modifier;** *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 289-306.

[31] Hansen, P.; Lindeberg, G.; **Importance of the α -Amino Group on the Selective Purification of Synthetic Histidine Peptides by Immobilised Metal ion Affinity Chromatography;** *J. Chromatogr. A*, **690** (1995) 155-159

[32] Rochow, E. G.; "Silicon and Silixones" Springer-Verlag, New York, (1987)

[33] Bergna, H. E.; "The Colloid Chemistry of Silica" DuPont, Washington, DC, 1th Edition (1990).

[34] Vollet, D. R.; Moreira, J. C.; Kubota, L. T.; Varela, J. A. and Gushikem, Y.; **Small Angle X-ray Scattering Study of Structural Changes in Silica Gel Modified with Organofunctional Groups**; *Colloids Surf.*, **40** (1989) 1-8.

[35] Léonardelli, S.; Facchini, L.; Fretigny, C.; Tougne, P. and Legrand, A. P.; **Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Study of Silica**; *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 6412-6418.

[36] Chuang, I.-S.; Kinney, D. R. and Maciel, G. E.; **Interior Hydroxyls of the Silica Gel System as Studied by ²⁹Si CP-MAS NMR Spectroscopy**; *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 8695-8705.

[37] Dufrenne, N. G.; Blitz, J. P. and Meverden, C. C.; **Reactions of Group IV Metallocene Dichlorides with Modified Silica Gel Surfaces**; *J. Microchem.* **55** (1997) 192-199

[38] Wovchko, E. A.; Camp, J. C.; Glass, J. A. Jr. And Yates, J. T. Jr.; **Active Sites on SiO₂: Role in CH₃OH Decomposition**; *Langmuir*, **11** (1995) 2592-2599.

[39] Slavov, S. V.; Chuang, K. T. and Sanger, A. R.: **Modification of the Surfaces of Silica, Silica-Alumina, and Aluminum Silicate with Chlorotrimethylsilane**; *J. Phys. Chem.*, **100** (1996) 16285-16292.

[40] Donald, E. L.; "Silanes Surfaces and Interfaces" Gordon and Breach Science Publishers, Volume 1, Colorado (1985).

[41] Adamson, A. W.; " Physical Chemistry of Surfaces", John Wiley & Sons, New York, 3rd edition (1976).

[42] Calvo, J. I.; Hernandez, A.; Pradanos, P.; Martinez, L. and Bowen, W. R.; **Pore Size Distributions in Microporous. 2. Bulk Characterization of Track-Etched Filters by Air Porometry and Mercury Porosimetry**; *J. Colloid Interface Sci.* **176** (1995) 467-478

[43] Hernandez, A.; Calvo, J. I.; Pradanos, P. and Tejerina, F.; **Pore Size Distributions of Track-Etched Membranes; Comparison of Surface and Bulk Porosities**; *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **138** (1998) 391-401.

- [44] Kumar, S. R.; Pillai, P. K. and Warriar, K. G. K.; **Synthesis of High Surface Area Silica by Solvent Exchange in Alkoxy Derived Silica Gels**; *Polyhedron*, 17 (1998) 1699-1703
- [45] Ciola, R. " Fundamentos da Catálise", EDUSP, São Paulo, 1ª edição (1981).
- [46] Leyden, D. E.; Luttrell, G. H.; **Preconcentration of Trace Metals Using Chelating Groups Immobilized Via Silylation**; *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1612.
- [47] Sugawara, K. F.; Weetall, H. H. and Shucker, G. D.; **Preparation, Properties, and Applications of 8-Hydroxyquinoline Immobilized Chelate**; *Anal. Chem.* 46 (1974) 489-492.
- [48] Vernom, F.; Eccles, H.; **Chelating Ion-Exchangers Containing 8-Hydroxyquinoline as the Functional Group**; *Anal. Chim. Acta*, 63 (1973) 403-414.
- [49] Kirkland, J. J.; Van Straten, M. A. and Claessens, H. A.; **High pH Mobile Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Columns**; *J. Chromatogr. A*, 691 (1995) 3-19.
- [50] Dang, Z.; Anderson, B. G.; Amenomiya, Y. and Morrow, B. A.; **Silica-Suported Zirconia. 1. Characterization by Infrared Spectroscopy**,

Temperature-Programmed Desorption, and X-ray Diffraction; *J. Phys. Chem.*, **99** (1995) 14437-14443.

[51] Ellestad, O. H.; Blindheim, U.; **Reaction of Titanium Tetrachloride With Silica Gel Surfaces;** *J. Mol. Catal.*, **33** (1985) 275-287.

[52] Ettre, L. S.; "High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives", Volume 1, edited by C. Horvath (Academic Press, New York, 1980), Chapter 1, pp. 1-65.

[53] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; " Introduction to Modern Liquid Chromatography". John Wiley, New York (1974).

[54] Airoidi, C.; Gushikem, Y. and Espínola, J. G. P.; **Adsorption of Divalente Cations on the Silica-Gel Surface Modified with N-(2-Aminoethyl-3-Aminopropyl) Groups;** *Colloid Surf.*, **17** (1986) 317-323.

[55] Alcântara, E. F. C.; **"Superfície de Sílica Gel Suportada com Acetilhidrazina - Propriedades, Caracterização e Quimissorção dos íons Metálicos Co (II), Cu (II), Ni (II) e Zn (II) em Etanol e Acetona"**. Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas-SP (1987).

[56] Adamson, A.W.; " Physical Chemistry of Surfaces ", John Wiley & Sons, New York, 4th edition (1982).

[57] Gallegos, D. P.; Smith, D. M. and Brinker, C. J.; **An NMR Technique for the Analysis of Pore Structure: Application to Mesopores and Micropores**; *J. Colloid Interface Sci.*, **124** (1988) 186-198.

[58] Farin, D.; Avnir, D.; **The Effects of the Fractal Geometry of Surfaces on the Adsorption Conformation of Polymers at Monolayer Coverage. Part I. The Case of Polystyrene**; *Colloids Surf.*, **37** (1989) 155-170.

[59] Mingalyov, P. G.; Fadeev, A. Y.; **Comment on the Theory of Protein Adsorption on a Biospecific Rigid Matrix**; *J. Chromatogr. A*, **764** (1997) 21-26.

[60] Hercules, M.; Cox, L. E.; Onisick, S.; Nichols, G. D. and Carver, J.; **Electron Spectroscopy (ESCA): Use for Trace Analysis**; *Anal. Chem.*, **45** (1973) 1973-1975.

[61] Tan, b. J.; Klabunde, K. J. and Sherwood, P. M. A.; **XPS Studies of Solvated Metal Atom Dispersed Catalysts. Evidence for Layered Cobalt-Manganese Particles on Alumina and Silica**; *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (1991) 855-861.

[62] Ewing, G. W.; "Metodos Instrumentais de Análise Química", Editora Edgard Blucher; Vol. 01; (1972).

[63] Leyden, D. E.; " Fundamentals of X-Ray Spectrometry as Applied to Energy Dispersive Techniques"; Tracor X-Ray Incorporated (1984).

[64] Tancredo, A.; Moreira, J. C.; Gushikem Y. and Nascimento, O. R.; **Electron Paramagnetic Resonance Study of CuCl₂ Adsorbed on Silica-Gel Surface Modified with 3(1-Imidazolyl)propyl Groups**; *Colloids Surf.*, **19** (1986) 41-45.

[65] Golubev, V. B.; Kudryavtsev, G. V.; Lisichkin, G. V. and Mil'chenko, D. V.; **ESR Study of Complex Formation Between Copper (II) and Chemically Modified Silicas**; *Russ. J. Phys. Chem.*, **59** (11) (1985) 1674-1677.

[66] Kiss, J. T., Pálinkó, I. and Molnár, A.; **Surface Properties of Silica Gel and Gel-Supported Ion-Exchanged Copper in Transformations of Various Molecular Probes: An Infrared Study**; *Spectrochim. Acta, Part A*, **52** (1996) 185-189.

[67] Fulcher, C.; Crowell, M. A.; Bayliss, R.; Holland, K. B. and Jezorek, J. R.; **Synthetic Aspects of the Characterization of some Silica-Bound Complexing Agents**; *Anal. Chim. Acta*, **129** (1981) 29-47.

[68] Sindorf, D. W.; Maciel, G. E.; **Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Study of Hydroxyl Sites on Dehydrated Silica Gel Surfaces, Using Silylation as a Probe**; *J. Phys. Chem.*, **87** (1983) 5516-5221.

- [69] Scholten, A. B.; Claessens, H. A.; Haan J. W. and Cramers, C. A.; **Chromatographic Activity of Residual Silanols of Alkylsilane Derivatized Silica Surfaces**; *J. Chromatogr. A*, **759** (1997) 36-46.
- [70] Scholten, A. B.; Haan, J. W.; Claessens, H. A.; Van de van, L. J. M. and Cramers, C. A.; **Fundamental Study of Residual Silanol Populations on Alkylsilane-Derivatized Silica Surfaces**; *Langmuir*, **12** (1996) 4741-4747.
- [71] Sindorf, D. W.; Maciel, G. E.; **Cross-Polarization/Magic-Angle-Spinning Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Study of Silica Gel Using Trimethylsilane Bonding as a Probe of Surface Geometry and Reactivity**; *J. Phys. Chem.*, **86** (1982) 5208-5219.
- [72] Menezes, M. L.; Moreira, J. C. and Campos, T. S.; **Adsorption of Various Ions from Acetone and Ethanol on Silica Gel Modified with 2-, 3-, and 4- Aminobenzoate**; *J. Colloid Interface Sci.*, **179** (1996) 207-210.
- [73] Howard, A. G.; Volkan, M. and Ataman, Y.; **Selective Pre-Concentration of Arsenite on Mercapto-Modified Silica Gel**; *Analyst*, **112** (1987) 159-162.
- [74] Kubota, L.T.; Moreira, J.C.; **Adsorption of Metal Ions from Ethanol on an Iminosalicyl-Modified Silica Gel**; *Analyst*, **114** (1989) 1385-1388.

[75] Moreira, J. C.; Pavan, L. C. and Gushikem, Y.; **Adsorption of Cu (II), Zn (II), Cd (II), Hg (II) and Pb (II) from Aqueous Solutions on a 2-Mercaptobenzimidazole-Modified Silica Gel**; *Mikrochim. Acta [wien]* III (1990) 107-115.

[76] Basiuk, V. A.; Gromovoy, T. Y.; **Comparative Study of Amino Acid Adsorption on Bare and Octadecyl Silica from Water Using High-Performance Liquid Chromatography**; *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 118 (1996) 127-140.

[77] Yamaki, S.; Isobe, T.; Okuyama, T. and Shinoda, T.; **High-Performance Liquid Chromatography of Peptides on a Microspherical Carbon Column**; *J. Chromatogr. A*, 729 (1996) 143-153.

[78] Gushikem, Y.; Silva, E. O.; **Cation Exchange of Divalente Metal Ions on Zirconium (IV) Phosphosilicate Cation Exchange**; *J. Braz. Chem. Soc.*, 1 (1990) 84-86.

[79] Donald, E.L.; Ward, T. Collins; "Chemically Modified Surfaces in Science and Industry", Gordon and Breach Science Publishers, Volume 2, Colorado (1987)

[80] Finette, G. M. S.; Mao, Q.-M. and Hearn, M. T. W.; **Comparative Studies on the Isothermal Characteristics of Proteins Adsorbed Under Batch Equilibrium Conditions to Ion-Exchange, Immobilised Metal Ion**

Affinity and Dye Affinity Matrices with Different Ionic Strength and Temperature Conditions; *J. Chromatogr. A*, 763 (1997) 71-90.

[81] Jinno, K.; Ichikawa, M.; Takata, I.; **Characterization of Octadecylsilica Stationary Phases by Spectroscopic Methods; *Chromatographia*, 37 (1993) 627- 634.**

[82] Brückner, H.; Wachsmann, M.; **Liquid Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers on a Silica-Bonded Chiral s-Triazine Column; *J. Chromatogr. A*, 728 (1996) 447-454.**

[83] Fernandez, M. A.; Carta, G.; **Characterization of Protein Adsorption by Composite Silica-Polyacrylamide Gel Anion Exchangers I. Equilibrium and Mass Transfer in Agitated Contactors; *J. Chromatogr. A*, 746 (1996) 169-183.**

[84] Elefterov, A. I.; Kolpachnikova, M. G.; Nesterenko, P. N. and Shpigun, O. A.; **Ion-Exchange Properties of Glutamic Acid-Bonded Silica; *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 179-188.**

[85] Nesterenko, P. N.; Elefterov, A. I. and Tarasenko, D. A.; **Selectivity of Chemically Bonded Zwitterion-Exchange Stationary Phases in Ion Chromatography; *J. Chromatogr. A*, 706 (1995) 59-68.**

[86] Gushikem Y.; Peixoto, C. R. M.; Rodrigues Filho, U. P.; Kubota, L. T. and Stadler, E.; **Electrochemical Properties of [Ru (edta) (H₂O)]⁻ Immobilized on a Zirconium (IV) Oxido-Coated Silica Gel Surface;** *J. Colloid Interface Sci.*, **184** (1996) 236-240.

[87] Vrancken, K. C.; Voort, P. V. D.; Hamers, I. G.; Vansant, E. F. and Grobet. P.; **Influence of Water in the Reaction of γ -Aminopropyltriethoxysilane with Silica Gel;** *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88** (1992) 3197-3200.

[88] “Tracor X-Ray Spectrace 5000, Operators Manual”; Tracor X-Ray.; (1989).

[89] Gushikem, Y.; Moreira, J. C.; **Adsorption of MX₂ (M= Mn, Ni, Cu, Zn, and Cd; X= Cl, Br, and I) and FeCl₃ by Modified Silica Surface With Imodazolylpropyl Group;** *J. Colloid Interface Sci.*, **107** (1985) 70-74

[90] Zaia, D. A. M.; Barreto, W. J.; **Spectrophotometric Method for the Simultaneous Determination of Proteins and Amino Acids with p-Benzoquinone;** *Anal. Chim. Acta*, **277** (1993) 89-95.

[91] Barreto, W. J.; Aquino, M. and Zaia, D. A. M.; **A New Method for Total Protein Determination;** *Anal. Lett.*, **23** (1990) 1279-1290.

- [92] Grushka, E.; Edward, J. K. Jr.; **Chemically Bonded Stationary Phases in Chromatography**; *Anal. Chim.* **49** (1977) 1004A-1012A.
- [93] Gushikem, Y.; Peixoto, C. R. M. and Kubota, L. T.; **Exchange Property of Titanium (IV) and Zircônio (IV) Oxides Grafted on Silica Gel Surface. Sorption of Chromium (IV) from an Acid Solution**; Proceedings of the International Conference on Ion Exchange (ICIE); (1991) 607-612.
- [94] Armistead, C. G.; Hockey, J. A.; **Reactions of Chloromethyl Silanes with Hydrated Aerosil Silicas**; *Trans. Faraday Soc.*, **63** (1967) 2549-2556.
- [95] Bond, G. C.; Flamerz, S. and Shukri, R.; **Structure and Reactivity of Transition-Metal Oxide Monolayers**; *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **87** (1989) 65-77.
- [96] Idowu, O. R.; Adewuyi, G. O.; **Sodium Benzoxazole-2-Sulfonate: A Derivatisation Reagent for the Analysis of Amines and Amino Acids by HPLC with Fluorescence or UV Detection**; *J. Liquid. Chromatogr.* **16**(12) (1993) 2501-2518.