



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**“Desenvolvimento de uma Nova Fase Estacionária para
Cromatografia por Troca Aniônica”**

Autora

Lúcia Maria Laboissière de Alencar Auler

Orientadora

Profa. Dra. Carol H. Collins

Campinas
Novembro de 2006

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

Auler, Lucia Maria Laboissière de Alencar.
Au51d Desenvolvimento de uma nova fase estacionária
para cromatografia por troca aniônica / Lucia Maria
Laboissière de Alencar Auler. -- Campinas, SP: [s.n],
2006.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
2. Troca aniônica. 3. Fase estacionária. I. Collins,
Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development of a new stationary phase for anion exchange chromatography

Palavras-chaves em inglês: HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Anionic exchange, Stationary phase

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (orientadora); Profa. Dra. Marina Tavares (IQ-USP); Profa. Dra. Maria Ângela de Barros Correia Menezes (CDTN-CNEN); Prof. Dr. Fábio Augusto (IQ-UNICAMP); Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 09/11/2006

À minha mãe e ao meu pai “in memoriam”,

Às minhas filhas, Juliana e Patrícia,

Ao Athos,

À espiritualidade,

Dedico, com amor, esta tese

"O mundo é composto de colunas
nas quais as partículas cósmicas
são separadas pelas grandes necessidades
de evoluir o sistema do ser."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela realização deste trabalho, pois sem o seu consentimento este não teria sido realizado.

Este trabalho foi desenvolvido no CDTN/CNEN em conjunto com o Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Unicamp. Foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Carol Collins, a quem não só admiro, mas me balizo pelo seu conhecimento, sua postura ética, transparência, honestidade e simplicidade. A ela agradeço por ter-me aceito e mostrado um caminho novo, acreditando sempre que pudesse trilhá-lo com sucesso

Ao Prof. Dr. Kenneth Collins, portador de uma grande capacidade de ensinar, pela valiosa colaboração e convivência.

À Profa. Dra. Isabel Jardim, que, além dos ensinamentos em cromatografia, valorizou-me nesta grande busca.

Ao Dr. César Silva, pela “co-orientação”, pois sem sua ajuda e dedicação esse trabalho demoraria para chegar a um bom termo. Agradeço também pelo companheirismo ao longo deste doutorado, pela boa vontade e paciência ao auxiliar-me.

Ao Engenheiro Eletrônico do CDTN/CNEN, Aimoré Dutra, que foi um verdadeiro guardião do laboratório de cromatografia durante os trabalhos experimentais. Sem dúvida, dificilmente estariam registradas neste texto estas belas separações cromatográficas sem a presença criativa e perseverante desse colega.

Ao CDTN / CNEN, pela disponibilização do Laboratório de Cromatografia Líquida para a realização dos experimentos.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Andréa Vidal do CDTN/CNEN, pelas ajudas inestimáveis, pelo estímulo, sempre me fazendo acreditar que eu chegaria ao final.

À Dra. Nilva P. Lopes, pelo companheirismo de muitos dias e noites durante esta longa jornada.

À Profa. Dra. Carla Bottoli, da UNICAMP, pelo coleguismo, sugestões e discussões.

À Carla, Mauricio e Joseane pelas agradáveis estadias em suas residências.

Aos amigos e colegas do LabCrom, Dânia Fonseca, Zahra F. Chaudry, Sonia Queiroz, Rosely Silva, Laís S. R. de Moraes, Camila Vigna, Lúcio F. C. Melo, Marcelo Ribani, Priscila Silva e Valtinho, que têm parte importante nesta minha história.

Ao Edivan Tonhi, pela amizade, disponibilidade e atenção em momentos de dificuldades no laboratório.

À Profa. Dra. Maria Ângela Menezes, pelo incentivo de iniciar este trabalho. À biblioteca do CDTN. À Elizabeth Kerpe pelas horas de dedicação, à Helena Palmieri, Lucia Souza, Juliana Batista, e a todos os colegas do Serviço de Química e Radioquímica à Liliam Leonel e à Profa. Dra. Maria José da UFMG, por muitas discussões e soluções....

À Juliana Auler e Patricia Auler, as jóias de minha passagem aqui na terra, por todo o apoio e aceitação da minha ausência durante este período de minha vida.

À minha mãe, guerreira a quem devo o exemplo de coragem e perseverança e aos meus irmãos sempre presentes....

À tia Iracema, segunda mãe, à Cacá, aos primos de Pirapora e à Raquel à quem devo a tranquilidade doméstica.

À todos os amigos e colegas que participaram direta ou indiretamente na construção deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1.1 Bacharelado e Licenciatura Plena em Química.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 1975.

1.2 Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares.

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1981.

Título da dissertação: “Aplicação de Traçadores Fluorescentes e Radioativos em Estudos Sedimentológicos”

Orientador: Jefferson Viana Bandeira

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN

Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN

Período: 1982 - Atual

Vínculo: Servidor Público Federal

Enquadramento funcional: Tecnologista Sênior

Áreas de atuação: química analítica, radioquímica, análise de traços e química ambiental.

E-mail: aulerlm@cdtn.br

3. ATIVIDADES ACADÊMICAS

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC/MG

Vínculo institucional: 1980 – 1985

Enquadramento funcional: Professor assistente

Áreas de atuação: ensino de graduação, Departamento de Física e Química

Disciplinas ministradas: Química Geral, Corrosão (aulas teóricas e práticas)

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

4.1 Artigo em periódico internacional:

AULER, L.M.L.A.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H.; New stationary phase for anion-exchange chromatography, Amsterdam, **Journal of Chromatography A**, v.1073, p. 147-153, 2005.

4.2 Publicações no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN): 05

4.3 Trabalhos recentes publicados em anais de congressos:

AULER, L.M.L.A.; MENEZES, M.A.; AMARAL, A.M.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H.; k_0 -INAA method and ion exchange chromatography working together. IN: WORLD TRIGA USERS CONFERENCE, 3, 2006, Belo Horizonte, Minas Gerais, BRAZIL. Scientific Programme. Belo horizonte, CDTN, 2006. P.59. Anais em fase de editoração. Trabalho completo.

AULER, L.M.L.A.; MENEZES, M.A.; AMARAL, A.M.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H.; Application of K_0 -ANI method in anion-exchange chromatography. In: ENAN MEETING ON NUCLEAR APPLICATIONS, 7, 2005, Rio de Janeiro, RJ. **Proceedings**: Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Energia Nuclear (ABEN), 2005. Trabalho completo.

AULER, L.M.L.A.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; LOPES, N.P.; COLLINS, C.H.; Chromatographic characterization of propylpyridinium silica for anion-exchange chromatography. In: HPLC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE SEPARATIONS AND RELATED TECHNIQUES, 29, 2005, Stockholm. Abstracts, 2005. P. 222.

AULER, L.M.L.A.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; LOPES, N.P.; COLLINS, C.H.; Avaliação Química e Cromatográfica de uma fase estacionária para cromatografia por troca aniônica. In: ENQA ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 13, 2005, Niteroi, CD de resumos. p. .

AULER, L.M.L.A.; COLLINS, C.H.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; A new stationary phase for anion-exchange chromatography. HPLC INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND EXHIBIT ON HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE SEPARATIONS AND RELATED TECHNIQUES, 28, 2004, Philadelphia, Pensilvania, USA. **Final program**. Philadelphia: [s. n.], 2004, .p.289.

AULER, L.M.L.A.; COLLINS, C.H.; SILVA, C.R.; Preparação e caracterização de uma nova fase estacionária para utilização em cromatografia de troca-iônica. CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, 26, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA (SBQ), 27, maio, 2004, Salvador, BA, Brasil. Trabalho completo.

AULER, L.M.L.A.; COLLINS, C.H.; SILVA, C.R.; COLLINS, K.E.; Propylpyridinium modified silica as stationary phase for anion chromatography. COLACRO CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CROMATOGRÁFIA E TÉCNICAS AFINS, 10, Outubro, 2004, Campos do Jordão, Brasil. **Livro de resumos**. São Carlos: Instituto Internacional de Cromatografia, 2004.p.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FASE ESTACIONÁRIA PARA CROMATOGRAFIA POR TROCA ANIÔNICA

Autora: Lúcia Maria Laboissière de Alencar Auler

Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins

Uma nova fase estacionária foi desenvolvida utilizando a sílica como suporte, para aplicação em Cromatografia por Troca Iônica na separação de ânions. A preparação desse suporte cromatográfico envolveu a modificação da sílica com cloropropiltrimetoxissilano seguido pela reação com a piridina para produzir 0,5 mmol g⁻¹ de grupos propilpiridínio carregados positivamente sobre a superfície da sílica. Esses grupos atuam como sítios de troca aniônica durante a separação cromatográfica. A nova fase foi caracterizada por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética de ¹³C e ²⁹Si no estado sólido e por cromatografia. A capacidade de troca da sílica modificada foi determinada pela concentração de íons cloreto trocáveis, por meio da análise por ativação neutrônica .

O estudo da estabilidade química do suporte cromatográfico, nas mesmas condições da separação, demonstra que a fase, mesmo sem nenhuma proteção, é estável até 12000 volumes de coluna.

A avaliação dos parâmetros cromatográficos das separações realizadas em um sistema com detecção por condutividade, sem supressão mostra que a sílica com o grupo propilpiridínio quimicamente ligado é uma fase estacionária bastante promissora para a separação de ânions em amostras contendo baixos teores dessas espécies.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NEW STATIONARY PHASE FOR ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Author: Lúcia Maria Laboissiere de Alencar Auler

Supervisor: Profa. Dra. Carol H. Collins

A new stationary phase based on silica was developed for application in Ion Exchange Chromatography for anion separation. The preparation of the new phase involved silanization of chromatographic silica particles with chloropropyl-trimethoxysilane to yield chloropropyl silica. The modified silica was then reacted with pyridine to produce positively charged propylpyridinium groups on the surface, which are the anion exchange sites. The new phase was characterized by elemental analysis and infrared and solid state ^{13}C and ^{29}Si NMR spectroscopies. The exchange capacity of the modified silica was investigated by determining its exchangeable chloride content using neutron activation analysis.

The stability of this phase, tested under the same conditions as for the separation, shows that this phase, although without protection, is stable to 12000 column volumes.

Chromatographic parameters evaluated using unsuppressed conductivity detection indicate that the chloropropylpyridinium silica is promising for separation and quantification of anions in samples with low concentrations of these species.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
CURRICULUM VITAE	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
SUMÁRIO.....	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Cromatografia para a Separação de Íons	1
1.1.1 Um Pouco de Sua História.....	1
1.1.2 O Problema da Detecção	4
1.1.3 Cromatografia de Íons (CI).....	6
1.1.4 A CTI Com Supressão	10
1.1.5 A CTI Sem Supressão.....	15
1.1.6 Capacidade de Troca.....	16
1.1.7 Mecanismo de separação	17
1.1.8 Os Picos do Sistema em CTI	18
1.2 Fases Estacionárias (FE).....	20
1.2.1 Sílica Modificada com Grupos Iônicos	23
1.2.2 Fases Estacionárias Poliméricas	25
1.2.3 Fases Estacionárias Monolíticas para CI	28
1.2.4 Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária	30
1.2.4.1 Escolha do Processo de Enchimento – Definição de Algumas Variáveis.....	30
1.2.4.2 Parâmetros Cromatográficos	31
1.3 Determinação da Capacidade de Troca	35
1.3.1 A Técnica.....	36
1.3.2 Reator TRIGA MARK I IPR-R1	36

1.3.3	Método k_0 de Ativação Neutrônica Instrumental	37
2.	OBJETIVO	39
2.1	Etapas do Trabalho	39
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	41
3.1	Equipamentos.....	41
3.2	Materiais	42
3.2.1	Reagentes e Solventes.....	42
3.2.2	Coluna cromatográfica.....	43
3.3	Preparação da Fase Estacionária (FE)	45
3.3.1	Etapa 1: Modificação Química da Superfície da Sílica com o Agente Sililante.....	45
3.3.2	Etapa 2: Preparação da Sílica Propilpiridínio (SilprPi).....	47
3.4	Caracterização Física e Química da Fase Estacionária.....	48
3.4.1	Análise Elementar	48
3.4.2	Análise Termogravimétrica	48
3.4.3	Medida de Área Superficial	49
3.4.4	Espectroscopia no Infravermelho	49
3.4.5	Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si e ^{13}C	49
3.4.6	Determinação da Capacidade de Troca pela Técnica de Ativação Neutrônica.....	50
3.4.6.1	Preparo da Amostra	50
3.4.6.2	Irradiação e Contagem	50
3.5	Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária.....	51
3.5.1	Enchimento da Coluna Cromatográfica.....	51
3.5.2	Condicionamento da Coluna Cromatográfica Pós-enchimento.....	53
3.5.3	Avaliação Cromatográfica da Fase Estacionária	54
3.5.3.1	Separação em Fase Normal	54
3.5.3.2	Separação por Troca Iônica	55
3.5.3.2.1	Condicionamento da Coluna para Separação por Troca Iônica	55
3.5.3.2.2	Otimização das Condições Analíticas para a Separação dos Ânions	56

3.5.3.3	Teste de pH	57
3.5.3.4	Teste de Estabilidade	58
3.6	Aplicações da Nova Fase Estacionária	58
3.6.1	Separação de Alguns Ânions	58
3.6.2	Quantificação de Ânions.....	59
3.6.2.1	Condições Operacionais da Análise	59
3.6.2.2	Preparo de Padrões e Construção da Curva Analítica	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1	Preparação da Sílica Propilpiridínio (SilprPi e SilprPi-H ₂ O).....	61
4.2	Caracterização Físico-Química.....	63
4.2.1	Análise Elementar.....	63
4.2.2	Análise Termogravimétrica	65
4.2.3	Espectroscopia no Infravermelho	66
4.2.4	Ressonância Magnética Nuclear de ²⁹ Si e ¹³ C.....	68
4.3	Determinação da Capacidade de Troca da Sílica Funcionalizada	73
4.4	Caracterização Cromatográfica.....	74
4.4.1	Separação em Fase Normal	74
4.4.2	Separação por Troca Iônica	78
4.4.2.1	A Escolha da Melhor Fase Móvel (FM).....	80
4.4.2.2	A Otimização da Concentração de Ácido Ftálico / TRIS	85
4.4.2.3	Determinação da Eficiência Máxima da SilprPi-H ₂ O por CTI.....	90
4.4.2.4	Teste de Estabilidade da FE SilprPi-H ₂ O	91
4.4.2.5	Efeito do pH Sobre a Retenção dos Ânions	95
4.5	Exploração de Possíveis Aplicações.....	99
4.5.1	Separação de Diversos ânions	99
4.5.2	Quantificação dos Ânions.....	101
5.	CONCLUSÕES.....	107
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático da cromatografia de íons com detecção por condutividade com supressão [2].	11
Figura 2 - Efeito da separação de ânions: A) sem supressão; B) com supressão química [1]. A linha identificada como NaOH representa o sinal do ruído causado pelos íons na FM antes da passagem pela coluna supressora.	13
Figura 3 - Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica amorfa: (1) vicinais, (2) geminais, (3) livres e (4) siloxano superficial.	22
Figura 4 - Polieletrólitos com centros de carga de dimetilamônio.....	25
Figura 5 - Reação do estireno (1) com divinilbenzeno (2) para produzir copolímeros de estireno- divinilbenzeno (3).....	26
Figura 6 - Reação do ácido metacrílico (1) com o divinilbenzeno (2) para produzir o copolímero metacrilato-divinilbenzeno (3).....	27
Figura 7 - Cromatograma obtido na separação de uma mistura de dois componentes [17].	31
Figura 8 - Determinação do fator de assimetria e alargamento do pico [119].	34
Figura 9 - Curvas da equação de van Deemter.[17]	35
Figura 10 - Esquema de uma coluna cromatográfica e suas conexões.	44
Figura 11 - Sistema utilizado para as duas etapas da síntese.	46
Figura 12 - Roto-torque com a suspensão da sílica SilprPi em clorofórmio.....	52
Figura 13 - Foto do sistema de enchimento de uma coluna cromatográfica.....	53
Figura 14 - Esquema da reação da modificação na superfície da sílica para produzir a SilprCl, após a hidrólise.....	61
Figura 15 - Esquema da reação da sílica cloropropil com piridina para produzir as sílicas SilprPi e SilprPi-H ₂ O.....	62
Figura 16 - Curvas termogravimétricas obtidas para a síntese em (A) meio anidro, (B) presença de água.	66
Figura 17 - Espectros no Infravermelho da (a) sílica Davisil, e da sílica silanizada: b) em meio anidro e (c) em presença de água.	67
Figura 18 - Espectros no Infravermelho da sílica funcionalizada com piridina(a) em meio anidro e (b) em presença de água.	67
Figura 19 - Grupos silanóis e siloxanos presentes na estrutura da sílica.	68

Figura 20 - Espécies de silício T que podem estar presentes na superfície da sílica silanizada com 3-cloropropiltrimetoxissilano.	69
Figura 21 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si da sílica pura (A), da SilprCl em meio anidro (B) e na presença de água (C).....	70
Figura 22 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da sílica silanizada, SilprCl, (A) em meio anidro e (B) em presença de água.	72
Figura 23 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da sílica propilpiridínio após a reação com a piridina. Os picos marcados com asteriscos representam bandas laterais.....	72
Figura 24 - Curvas da altura de pratos (H) para o nitronaftaleno, em diferentes vazões de FM para as colunas de 150 x 3,9 mm recheadas com as fases SilprPi (coluna 1) e SilprPi-H ₂ O (colunas 2, 3 e 4). Condições: FM: hexano:diclorometano 95:5 (v/v). Detecção UV a 254 nm e volume de injeção 5 μL	75
Figura 25 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi. Condições cromatográficas: FM: hexano:diclorometano 95:5(v/v); vazão: 0,40 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μL . Detecção: UV a 254 nm; mistura teste: 1 – benzeno; 2 – antraceno; 3 – álcool benzílico; 4 – benzonitrila; 5 – nitronaftaleno.....	76
Figura 26 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: hexano:diclorometano 95:5 (v/v); vazão: 0,40 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μL . Detecção: UV a 254 nm. Mistura teste: 1 – benzeno; 2 – antraceno; 3 – álcool benzílico; 4 – benzonitrila; 5 – nitronaftaleno.:	77
Figura 27 – Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μL . Detector: condutividade.	79
Figura 28 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 5,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 4,8 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μL . Detector: condutividade.	80
Figura 29 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: ácido benzóico 4,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 3,5 mmol L ⁻¹ . Vazão: 1,5 mL min ⁻¹ ; pH 5,0. Volume de injeção: 20 μL ; Detector: condutividade.	82
Figura 30 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ /	

TRIS 2,9 mmol L ⁻¹ ; pH 5,0; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.	84
Figura 31 - Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a FE SilprPi-H ₂ O na separação de cloreto (1), nitrito (2), brometo (3), nitrato (4) e o pico do sistema (*). Condições cromatográficas: (A) FM: ácido ftálico 1,5 mmol L ⁻¹ /TRIS 1,44 mmol L ⁻¹ ; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ ; (B) ácido ftálico 0,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 0,48 mmol L ⁻¹ ; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade	86
Figura 32 - Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a FE SilprPi-H ₂ O na separação de cloreto (1), nitrito (2), brometo (3), nitrato (4) e o pico do sistema (*). Condições cromatográficas: (A) FM: ácido ftálico 3,0 mmol L ⁻¹ ; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ ; (B) ácido ftálico 3,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,9 mmol L ⁻¹ ; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.	86
Figura 33 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.	87
Figura 34 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H ₂ O Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 10 mmol L ⁻¹ / TRIS 10,2 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade	88
Figura 35 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H ₂ O, após o uso com altas concentrações de tampão. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade	89
Figura 36 - Curvas de altura de prato para o cloreto, brometo e nitrato em diferentes vazões de fase móvel para a coluna de 150 x 3,9 mm recheada com a FE SilprPi-H ₂ O. Condições: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade.	90
Figura 37 - Parâmetros cromatográficos obtidos durante o teste de estabilidade da FE SilprPi-H ₂ O. Coluna: 60 X 3,9 mm. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ ; pH 4,1; vazão: 0,8 mL min ⁻¹ (dia) e 0,1 mL min ⁻¹ (noite). Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. Amostra de referência CRM409 - água de chuva.	93
Figura 38 – Cromatogramas obtidos durante e depois do teste de estabilidade com a FE SilprPi-H ₂ O. Coluna: 60 x 3,9 mm Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ ; pH 4,2;; Mistura teste: 1 – cloreto; 2 – nitrato.....	95

- Figura 39 - Cromatograma obtido com a coluna de 60 x 3,9mm, recheada com a FE SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. Mistura: 1 – cloreto; 2 – nitrito; 3 – nitrato, 4 – pico do sistema. 96
- Figura 40 – Separação de uma mistura de ânions inorgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade 99
- Figura 41 - Separação de ânions orgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. Mistura de ânions: 1 acetato ; 2 lactato; 3 succinato; * “pico do sistema”. 100
- Figura 42 -. Separação de ânions inorgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. 100
- Figura 43 – Separação de uma amostra ambiental. FE: SilprPi-H₂O. Mistura de ânions: 1 cloreto ; 2 nitrato. Amostra: água de chuva (amostra de referência da Comunidade Européia). Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. 101
- Figura 44 – Curva analítica para cloreto e nitrato utilizando a coluna SilprPi-H₂O 103
- Figura 45 - Curva analítica para cloreto e nitrato em uma coluna polimérica com grupamento funcional de amônio quaternário..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das técnicas para a Determinação Simultânea de Ânions e Cátions por CI [49].....	9
Tabela 2 – Porcentagens de C, H e N e valores do grau de recobrimento (χ) dos grupos orgânicos na superfície das sílicas silanizadas e das sílicas funcionalizadas, em diferentes meios reacionais	64
Tabela 3 - Capacidade de troca para a sílica funcionalizada, SilprPi, sintetizada em meio anidro e em presença de água, na determinação da concentração de contra-íon cloreto.....	73
Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos na coluna recheada com a FE SilprPi (coluna 1) usando condições de fase normal.....	76
Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O (coluna 2) usando condições de fase normal	77
Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos obtidos para o nitronaftaleno na vazão ótima nas colunas SilprPi e SilprPi-H ₂ O	78
Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O usando ácido benzóico 4,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 3,5 mmol L ⁻¹ como fase móvel.....	83
Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 5,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 6,4 mmol L ⁻¹ ; pH 5,0.....	84
Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O usando ácido ftálico 3,0 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,9 mmol L ⁻¹ como fase móvel; pH 4,1.....	87
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H ₂ O usando ácido ftálico 2,5 mmol L ⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L ⁻¹ como fase móvel; pH 4,2.....	88
Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions Cl ⁻ , Br ⁻ e NO ₃ ⁻ em diferentes vazões de FM.....	91
Tabela 12 - Parâmetros cromatográficos obtidos para o Cl ⁻ , NO ₂ ⁻ , e NO ₃ ⁻ com a SilprPi-H ₂ O em diferentes pH da fase móvel tampão de ftalato 2,5mmol L ⁻¹	98
Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos após regressão linear para coluna SilprPi-H ₂ O.....	102

Tabela 14 - Comparação dos resultados obtidos para o ânion cloreto nas amostras de referência AR408 e AR409	104
Tabela 15 - Comparação dos resultados obtidos para o ânion nitrato nas amostras de referência AR408 e AR409	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cromatografia para a Separação de Íons

1.1.1 Um Pouco de Sua História

A Cromatografia de Íons, segundo Small [1], é o resultado da fusão de duas grandes áreas de desenvolvimento da química: a cromatografia e a troca iônica. A tecnologia de troca iônica iniciou-se em 1935, com os trabalhos pioneiros de Adams e Holmes, os quais descobriram que alguns polímeros orgânicos sintéticos, referidos usualmente como resinas, eram capazes de trocar íons. Essas pesquisas conduziram à síntese do primeiro trocador iônico por condensação de fenol, ou de seus derivados, com formaldeído [1-3]. Daí em diante, a importância das resinas foi reconhecida tanto no meio acadêmico quanto no meio industrial. Isso conduziu ao rápido desenvolvimento de uma grande variedade de trocadores iônicos, baseados em polímeros orgânicos derivatizados.

O uso de trocadores iônicos como metodologia para separar compostos ou íons teve seu ponto de impacto com o surgimento do Projeto Manhattan. Um dos objetivos principais do projeto foi a análise dos produtos de fissão do reator nuclear com a finalidade de obter plutônio, utilizado como armamento nuclear, e de dispor os rejeitos gerados [3-7].

A fissão nuclear ocorre quando alguns núclídeos, tais como o urânio-235 (natural) e o plutônio-239 (artificial), dividem-se em duas partes aproximadamente iguais quando são atingidos por um nêutron. Esta reação libera grande quantidade de energia e, em geral, dois ou três novos nêutrons são formados. Com isso, sucessivas colisões ocorrem e, quando não são controladas e ocorrem na presença de moderadores, são as responsáveis pelas explosões das bombas atômicas [8, 9].

Dentre os produtos da fissão encontram-se os isótopos radioativos da série dos lantanídeos que, quando separados adequadamente, servem como indicadores no processo de recuperação de alguns produtos de fissão, bem como monitores do nível de perigo radiológico. A análise individual de alguns lantanídeos representava um desafio frente aos métodos de separação devido às suas propriedades químicas e físicas muito semelhantes. Entretanto, o Projeto Manhattan contribuiu também no desenvolvimento de diversas metodologias para preparar isoladamente alguns elementos do grupo dos lantanídeos, as quais resultaram na separação das chamadas Terras Raras [3-7].

Em 1942, químicos do “Metalurgical Laboratory”, na Universidade de Chicago [2], observaram que resinas sintéticas de troca iônica absorviam produtos de fissão do urânio. Em 1943, parte desse grupo de pesquisadores mudou para Oak Ridge, Estado de Tennessee, onde resinas de troca catiônica foram utilizadas para separar os lantanídeos e isolar o promécio dos produtos de fissão [3, 4], preenchendo essa lacuna na tabela periódica. Entre 1942 e 1943, Boyd e colaboradores [5] também demonstraram a aplicabilidade da resina de troca iônica para a adsorção dos produtos de fissão, o que possibilitou a separação de alguns lantanídeos.

Devido à natureza confidencial do Projeto Manhattan, não houve publicações das técnicas analíticas desenvolvidas antes do período pós-guerra. Assim, somente em 1947, por ocasião de um Simpósio da American Chemical Society, em Nova York, vários artigos foram publicados no *Journal of American Chemical Society*, um volume que compreende um clássico da literatura de troca iônica. Cerca de duas décadas após esse período, a troca iônica foi incluída na chamada “Era do Ouro”, na qual diversos livros foram publicados, contribuindo com novos métodos para a ciência de separação [10-12].

Osborn, em 1953 [13], classificou cerca de mil artigos sobre o uso analítico da troca iônica, mas, enquanto as aplicações de troca iônica tiveram um crescimento explosivo, a velocidade das separações ainda era uma limitação. Fritz e Pietrzyk, em 1961 [2, 14], realizaram separações por troca aniônica de complexos de cloreto de

alguns metais de transição na forma $[MCl_x]^{y-}$ que demoravam mais de nove horas para serem realizadas. Esses trabalhos conduziram à obtenção de diversas patentes de resinas de troca iônica derivadas de estireno e de acrilato.

Os métodos clássicos de monitoramento de uma separação por troca iônica são descontínuos. Isto significa que as quantidades de eluente que passam pela coluna são coletadas em diferentes frações. O volume da fração coletada é feito por contagem de gotas ou medida de volume. A partir daí, analisa-se separadamente cada uma das frações, estabelecendo-se uma relação entre a quantidade de soluto por volume médio de cada uma das frações. Esse processo é limitado pelo longo tempo de análise e pela grande quantidade de amostra necessária [15].

Paralelo aos avanços relacionados à troca iônica, a cromatografia foi ganhando espaço na separação de íons. A separação de aminoácidos foi aperfeiçoada por Moore e Stein [16], que posteriormente, mecanizaram-na, usando uma bomba peristáltica para empurrar a fase móvel (FM) e um fotômetro para a detecção. Em 1959, esse sistema para a análise de aminoácidos foi modificado por Hamilton e Andrews, com a introdução de uma bomba similar as usadas hoje em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) [17]. Na década de sessenta, Hamilton [18, 19] utilizou a técnica de cromatografia por troca iônica automatizada para a separação de aminoácidos. Foi definida a posição de 135 aminoácidos em um tempo de análise de 21 horas, usando uma coluna de tamanho 125 x 0,636 cm de diâmetro interno, recheada com partículas esféricas de resina de tamanho de 17,5 μm (Dowex 50x8), acoplada a um fotômetro.

Horváth e Lipsky, em 1964, na tentativa de construir um cromatógrafo a líquido, fizeram um equipamento análogo ao utilizado em cromatografia gasosa, cujos componentes tiveram que ser desenvolvidos ou adaptados para esse propósito. Em 3 de agosto de 1966, eles obtiveram a primeira publicação de cromatografia por troca iônica na separação de compostos orgânicos [20, 21].

Por volta dos anos 70, a Cromatografia Líquida aplicada à substâncias orgânicas iniciou a sua jornada de “Alta Pressão”. Na Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (CLAE), também denominada Cromatografia Líquida de Alto Desempenho a fase móvel é um líquido enquanto a fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido sorvido, imobilizado ou quimicamente ligado na superfície do suporte sólido. A CLAE (em inglês, High Performance Liquid Chromatography-HPLC) abrange todas as técnicas de Cromatografia que requerem pressões elevadas para forçar a passagem de uma fase móvel líquida pelo leito cromatográfico da fase estacionária [22].

A Cromatografia por Troca Iônica (CTI) como uma modalidade da CLAE tornou-se uma técnica muito difundida. Em 1970, Salmon [23] apresentou uma importante revisão do estado da arte na Terceira Conferência de Química Analítica da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) em Budapeste. Nessa revisão, ele defendeu a tese de que a troca iônica somente seria útil à análise química se pudesse ser acoplada a um sistema de detecção automatizado e a um sistema para registrar os sinais obtidos. Nessa mesma época, Kirkland realizou tais experimentos, os quais se encontram discutidos em seu livro [24].

Zweig [25], em 1972, publicou uma revisão abrangendo 600 artigos relacionados à teoria geral da cromatografia, destacando diferentes mecanismos de separação. Embora essa coletânea de trabalhos não seja especificamente de troca iônica, são referidas algumas aplicações de fases quimicamente ligadas utilizadas em troca iônica.

No transcorrer dos anos, vários trabalhos foram publicados mostrando as vantagens da Cromatografia por Troca Iônica utilizando partículas de sílica ou materiais poliméricos como suporte e uma grande variedade de novos trocadores de íons inorgânicos [1, 15, 26].

1.1.2 O Problema da Detecção

A Cromatografia por Troca Iônica (CTI) foi inicialmente realizada utilizando-se materiais com alta capacidade de trocar íons com a fase móvel (capacidade de

troca -ver 1.1.6). Com isso, era necessária uma alta concentração de eletrólitos para eluir a maioria dos analitos iônicos. Como consequência, a condutividade dos componentes da fase móvel sobrepuja a dos analitos, reduzindo a detectividade do detector. Um excelente artifício para resolver esse problema foi separar a maioria dos íons metálicos complexando-os na forma de cloretos com uma mistura de ácidos inorgânicos fortes em diferentes concentrações. Nesse processo, foram utilizadas resinas com baixa capacidade de troca, praticando a cromatografia por fluxo forçado e detecção por absorção de luz na região do ultravioleta [27, 28].

Verpoorte e Svendsen [29], em 1974, divulgaram a técnica de cromatografia por troca iônica como uma das mais promissoras para a separação de misturas complexas de alcalóides utilizando um detector de absorção no ultravioleta. O sistema de detecção foi útil para a separação da maioria dos compostos orgânicos, como os corantes, as proteínas, os produtos farmacêuticos e os polímeros sintéticos. Porém, ainda continuava sendo um entrave para a separação dos analitos que não apresentam grupamentos cromóforos, como os íons de metais alcalinos, de alcalinos terrosos, os halogenetos, o sulfato, e o fosfato, dentre outros, pois esses não absorvem luz na região do ultravioleta e visível [1, 3, 11, 30].

Um detector condutométrico para a quantificação de íons inorgânicos e orgânicos foi desenvolvido por Small, Stevens e Bauman em 1975. Nesse ano, foi publicado o novo método que usava uma célula de condutividade como detector, fato esse marcante para o início da cromatografia por troca iônica moderna [31].

A detecção por condutividade possui duas grandes vantagens para a análise de íons inorgânicos. A primeira é que todos os íons em solução são eletricamente condutores, de forma que a condutividade é universal em resposta; e a segunda é que esse tipo de detector é relativamente simples para construir e operar. Além disso, responde de forma previsível às mudanças de concentração e é fácil de ser miniaturizado [32].

Uma desvantagem apresentada pela detecção por condutividade foi a elevada condutância do eluente presente nas separações cromatográficas de íons. Esse

problema foi resolvido introduzindo-se uma coluna supressora para o eluente, posicionada imediatamente após a coluna analítica de troca iônica. Essa coluna reduziu a condutância do ruído de fundo do eluente, aumentando simultaneamente a condutância elétrica dos íons do analito [1, 2, 14, 30, 32].

A Dow Chemical patenteou essa nova técnica de detecção por condutividade com supressão, chamada Cromatografia de Íons, e concedeu a licença a Durrum Instruments, que, mais tarde, tornou-se a Dionex para comercialização de um equipamento chamado de “Cromatógrafo de Íons”, marcando a condutometria com supressão. O primeiro Cromatógrafo foi apresentado ao público no Simpósio da American Chemical Society em Chicago [3, 31, 33, 34].

1.1.3 Cromatografia de Íons (CI)

A Cromatografia de Íons (CI), desenvolvida por Small [1], inclui todos os métodos cromatográficos que envolvem os mecanismos baseados em troca iônica. Após, Fritz e colaboradores [28, 30] utilizaram o nome Cromatografia de Íons para descrever as separações cromatográficas de espécies iônicas realizadas através de uma coluna de troca iônica com detecção automatizada. Segundo Sarzanini [35, 36] a CI é um processo baseado na troca reversível de íons entre uma solução e um sólido, um material insolúvel polimérico ou inorgânico contendo íons fixos e contra-íons trocáveis. Os analitos são separados com base em suas diferentes afinidades [37].

Atualmente, a CI abrange várias modalidades além do clássico mecanismo de troca iônica, tais como a Cromatografia por Troca Iônica (CTI), a Cromatografia por Par Iônico (CPI, também chamada Cromatografia por Troca Iônica Dinâmica), a Cromatografia por Interação de Íons (CII), a Cromatografia por Exclusão de Íons (CEI) e a Cromatografia por Quelação de Íons (CQI) [35-37].

Por meio desses métodos, é possível separar uma amostra contendo ácidos carboxílicos, bases orgânicas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, ânions

inorgânicos, cátions metálicos e complexos que apresentam carga [38]. Segundo Collins et. al. [17], uma amostra iônica consiste em uma mistura contendo um ou mais compostos iônicos ou compostos orgânicos ionizados ou ionizáveis. De uma outra forma, um soluto iônico é uma molécula que contém um ou mais grupos funcionais capazes de ter comportamento de ácido ou base no intervalo de pH usual em CLAE. O intervalo de pH em CLAE, para ocorrer a separação destas espécies, é de $2 < \text{pH} < 8$, para colunas recheadas cujo suporte é sílica, e $1 < \text{pH} < 14$, para colunas recheadas com fases estáveis nessa faixa de pH.

A Cromatografia por Troca Iônica (CTI) consiste em um método tendo como base um processo dinâmico de troca iônica ocorrendo entre a fase móvel e grupos de troca iônica ligados ao material do suporte. Com as colunas de troca catiônica ou aniônica são usadas soluções diluídas de íons como eluente para separar, respectivamente, cátions ou ânions [35].

O uso de um detector condutométrico na CTI permite a utilização de dois modos cromatográficos: *com supressão e sem supressão*. No primeiro modo, o eluato (FM que sai da coluna), antes da detecção, passa através de uma unidade supressora na qual a condutividade da fase móvel é reduzida bastante, de forma que os íons da amostra podem ser detectados sem correção da linha de base.

Os métodos que utilizam a configuração com coluna supressora ou outro sistema supressor são referidos como: Cromatografia de Íons com Supressão Química, Cromatografia de Íons com Supressão, Cromatografia de Íons com Supressão de Eluente e Cromatografia de Íons com Colunas Duplas [39].

A CTI sem supressão é realizada sem o uso de uma unidade supressora, com colunas recheadas com fases estacionárias para troca iônica de baixa capacidade de troca e eluentes diluídos, de maneira que a condutividade devido à fase móvel é igualmente baixa. Esse método tem uma detectabilidade menor do que a cromatografia com coluna supressora. Alguns nomes são propostos, tais como: Cromatografia de Íons Sem Supressão, Cromatografia de Íons em Coluna Única e Cromatografia de Íons com Supressão Eletrônica [1-3, 30, 33, 35, 39].

Vários estudos têm sido realizados para viabilizar a determinação simultânea de ânions e cátions com o objetivo de minimizar o trabalho analítico, o consumo de tempo e o alto custo de materiais necessários à análise. O processo usual utilizando CTI sem supressão para determinar a composição iônica total, aniônica e catiônica de uma amostra consiste em fazer duas corridas cromatográficas aplicando-se diferentes metodologias (colunas, eluentes e sistema de detecção) e injetando-se alíquotas da mesma amostra separadamente. Deguchi e Ito [40] fizeram referência a quatro metodologias, descritas na literatura, que são utilizadas para separar ânions e cátions em uma mesma corrida cromatográfica. A primeira usa uma reação de complexação para transformar cátions metálicos em ânions complexos, os quais são separados em uma coluna de troca aniônica juntamente com os demais ânions presentes na amostra [41, 42]. O segundo método usa colunas de troca catiônica e troca aniônica conectadas em série [43, 44] ou usa uma única coluna de troca iônica recheada com ambas as resinas de troca catiônica e aniônica, também chamada coluna de troca iônica de leito misto [45]. O terceiro método utiliza colunas de troca aniônica e catiônica em série, mas em combinação com a técnica de colunas acopladas. Mesmo com esta configuração, é necessário que o ajuste da coluna comutada seja cuidadosamente regulado para evitar-se a sobreposição dos picos. Uma quarta opção de configuração é o uso de uma única coluna de troca catiônica fracamente ácida para separar cátions por troca iônica e ânions por exclusão de íons. Um método similar usa uma única coluna ODS (sílica octadecil) revestida com uma fase estacionária zwiteriônica. São considerados trocadores iônicos zwiteriônicos somente os materiais que contêm grupos com cargas opostas presentes em uma única molécula, ligados ou imobilizados.[46-48].

Recentemente, Nesterenko [49] propôs uma classificação mais detalhada, baseada na associação entre os diversos métodos utilizados para a separação simultânea de ânions e cátions e as fases estacionárias disponíveis comercialmente aplicadas à troca iônica. Um esquema dessa classificação é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação das técnicas para a Determinação Simultânea de Ânions e Cátions por CI [49].

SEPARAÇÃO			
I-Técnicas de Multi-colunas			
Sistemas Multi-eluentes		Sistemas Mono-eluentes	
Colunas Paralelas	Colunas em Série	Colunas acopladas	
II-Técnicas com uma Única Coluna			
Cromatografia por troca de cátions e por exclusão de íons			
Separação em colunas zwitteriônicas			
Colunas de leito misto	Colunas de partículas esféricas	Moléculas zwitteriônicas imobilizadas	Camadas mistas
III-Cromatografia por troca de ânions e complexos metálicos carregados negativamente			
DETECÇÃO			
Sistema de detecção único		Sistema de detecção múltiplo	

A técnica de colunas múltiplas implica a determinação simultânea de ânions e cátions utilizando-se uma configuração que substitui o uso de dois cromatógrafos de íons separados. A principal diferença entre usar um sistema cromatográfico de íons com colunas paralelas e dois sistemas de CTI individuais está no uso de uma válvula de injeção conjunta, que permite a utilização de várias metodologias simultaneamente.

Dabek-Zlotorzynska e Dlouhy [50], em 1993, utilizaram uma nova configuração de CTI composta por quatro Cromatógrafos de Íons (três em modo gradiente e um em isocrático), quatro membranas supressoras, quatro colunas de guarda, quatro detectores e dois computadores. Esse sistema foi aplicado para a determinação simultânea de dez ânions inorgânicos e orgânicos e dez cátions em amostras de aerossóis. A vantagem do uso desse sistema é a multiplicidade de condições que pode ser aplicada simultaneamente, mas as principais desvantagens

de todos os sistemas de CTI em paralelo são o alto custo da análise e da manutenção e a baixa confiabilidade.

Uma simplificação dos sistemas que aplicam múltiplas colunas é o uso de colunas de troca catiônica e aniônica em série. Com essa configuração, utiliza-se somente um eluente em modo isocrático e um ou mais sistemas de detecção, dependendo das espécies a serem separadas e da concentração das mesmas na amostra. Uma dificuldade associada com colunas em série está na alta pressão necessária para empurrar a FM e uma célula de detecção resistente à pressão gerada. Recomenda-se, nesse caso, o uso de colunas pequenas com tamanho de partículas maior que 10 μm .

Em relação ao sistema de detecção mais adequado à separação simultânea de ânions e cátions a questão permanece em aberto. Do ponto de vista de simplicidade, custo e ausência de alargamento extra de pico é preferível o uso de um detector universal. Por outro lado, uma baixa seletividade e eficiência de separação podem ser compensadas pelo uso de um segundo sistema de detecção, tais como um plasma indutivamente acoplado com detecção por espectroscopia ótica de emissão (ICP OES) ou dois eletrodos seletivos de íons em série.

1.1.4 A CTI Com Supressão

A condutância é um parâmetro que expressa a resistência eletrolítica de uma solução e é dependente da área dos eletrodos, bem como da distância entre eles e da concentração do eletrólito, conforme a equação [51]:

$$G = \frac{(\lambda_+ + \lambda_-)C}{1000\Theta}$$

em que: G = condutância do eletrólito (microSiemens, μS)

λ_+ = condutividade iônica do cátion

λ_- = condutividade iônica do ânion

$(\lambda_+ + \lambda_-)$ = condutividade iônica equivalente ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$);

C = Concentração (mol L^{-1});

Θ = Constante da cela (cm^{-1}).

Embora a condutividade seja uma propriedade universal das espécies iônicas em solução e a condutância tenha uma relação de dependência com a concentração dos íons em solução, existem determinados íons cuja detecção é mascarada pela presença do ruído da linha de base causado pela condutância dos íons na FM que induzem a eluição. Assim, íons em uma amostra com baixa condutância dificilmente poderiam ser detectados em baixos teores devido à elevada condutância do eluente.

A idéia da supressão surgiu para corrigir alguns problemas decorrentes de separações realizadas por fases estacionárias com capacidade de troca elevada. Nessas fases, as separações são acompanhadas de ácidos ou bases fortes como fase móvel e de força iônica equivalente aos sítios ionizáveis da fase estacionária.

A Cromatografia com Supressão consiste em um método no qual um dispositivo adicional, chamado supressor, é inserido entre a coluna analítica e o detector de condutividade, como mostra a Figura 1:

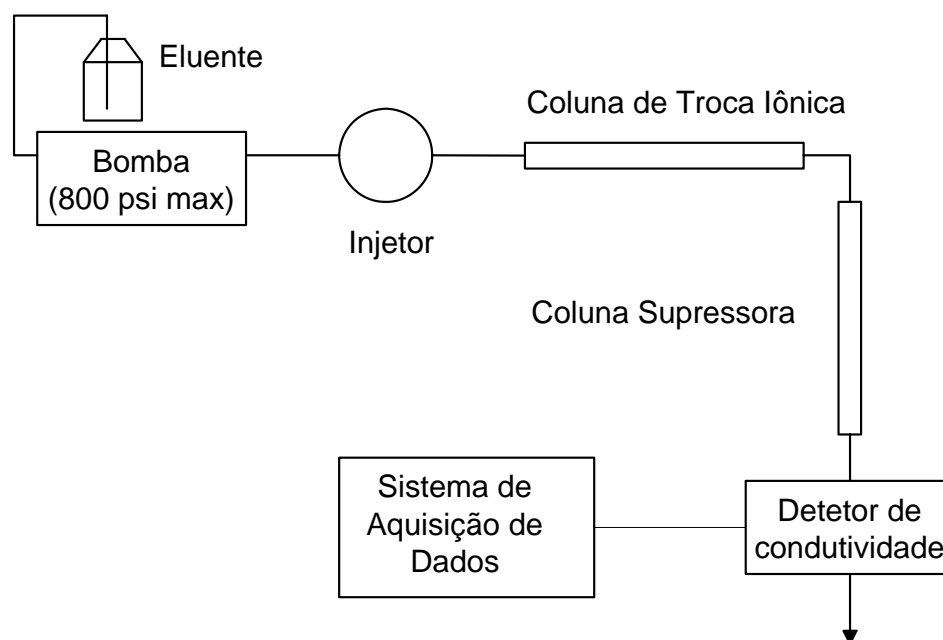
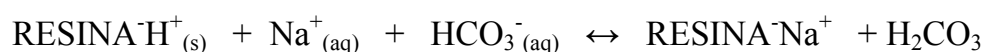


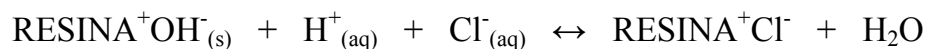
Figura 1 - Diagrama esquemático da cromatografia de íons com detecção por condutividade com supressão [2].

A função do supressor é aumentar a detectabilidade do íon (analito) da amostra utilizando-se um detector de condutividade. Com essa finalidade, a coluna supressora é recheada com uma segunda resina de troca iônica que converte os íons da fase móvel (FM) às espécies moleculares, removendo ou neutralizando os íons do eletrólito (FM) sem afetar os íons de interesse. As duas colunas, a supressora e a analítica, compõem uma combinação de forma que a maior condutância seja devida à espécie de interesse.

Na separação de ânions (analitos), os eluentes mais comuns são carbonato ou bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio, e a coluna supressora é um trocador de cátions na forma ácida. A reação de equilíbrio na coluna supressora para os íons monovalentes pode ser representada como:

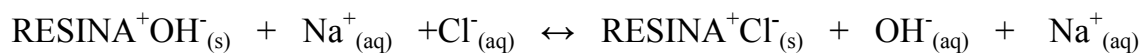


Quando cátions (analito) estão sendo separados, freqüentemente se utiliza HCl como reagente eluente e, na coluna supressora, uma resina de troca aniônica na forma de íon hidróxido. O produto da reação no supressor é a água.

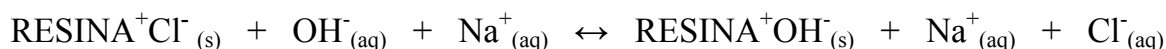


Na Figura 2, a título de exemplo, está representado um esquema para a separação de uma mistura de ânions utilizando uma coluna supressora, mostrando o efeito da supressão do eluente sobre o sinal do analito.

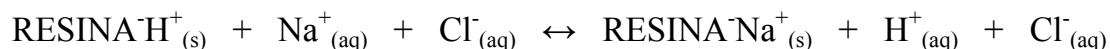
Se uma amostra contendo ânions, tais como fluoreto, cloreto e sulfato, é separada em uma coluna cromatográfica com hidróxido de sódio como eluente, a reação de retenção na coluna analítica pode ser representada como:



na qual o íon eluente (OH^-) da resina de separação é deslocado pelos ânions da amostra presentes na fase móvel. A reação de eluição /deslocamento é:



Após a eluição / deslocamento dos ânions da amostra, a coluna supressora remove os cátions presentes no eluente:



Nesse sistema, o efluente flui através da coluna para separar os ânions quando o efluente chega na coluna supressora. Ela tem a função de trocar os cátions do eluente por H^+ , neutralizando o íon hidroxila. Esse mecanismo de troca origina uma redução do sinal do background a quase zero.

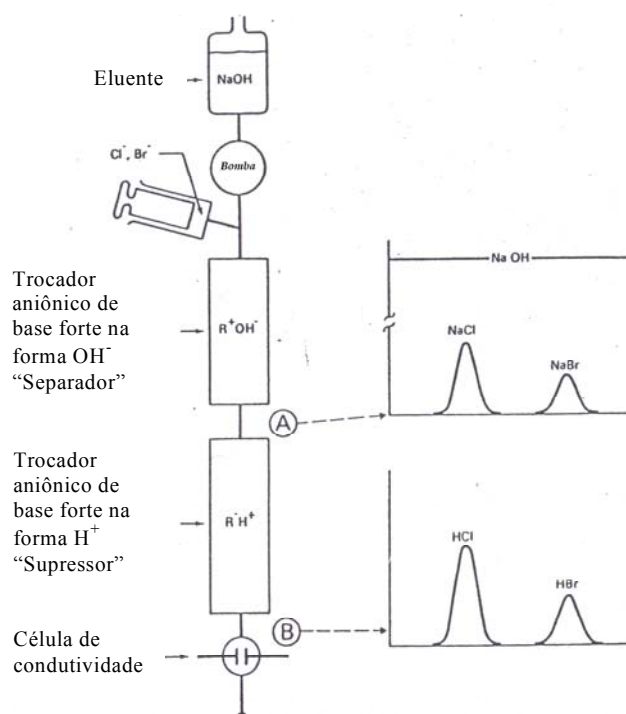


Figura 2 - Efeito da separação de ânions: A) sem supressão; B) com supressão química [1]. A linha identificada como NaOH representa o sinal do ruído causado pelos íons na FM antes da passagem pela coluna supressora.

Para a separação de ânions seria adequado escolher como FM um eluente de base forte que poderia ser neutralizado em uma coluna supressora condicionada com um ácido forte. Por outro lado, o íon OH^- é um dos menos retidos em relação aos vários ânions. Como resultado de um fator de seletividade desfavorável, até mesmo para eluir íons de atividade moderada, é necessário usar eluentes de OH^- com concentrações elevadas, implicando uma redução do tempo de vida da coluna [31].

Na supressão, o uso de bases ou ácidos fortes para a separação de ânions ou cátions, respectivamente, é incompatível com fases estacionárias a base de sílica. Devido a esse fator, a supressão ficou condicionada à utilização de materiais poliméricos como fases estacionárias, a pressão abaixo de 5 MPa (800 psi) com tamanho de partícula de 30-40 μm , bem maior do que os microparticulados de 5 μm utilizados em CLAE.

Como consequência, a eficiência da separação é baixa, da ordem de 0,5 a 2,0 pratos/s, em contraste com separações feitas com fases estacionárias a base de sílica, que alcançavam valores de eficiência 50 vezes maiores [2]. Outra desvantagem do uso de uma coluna supressora é o requisito de que a mesma precisa de regeneração, implicando interrupção freqüente das separações analíticas para a realização dessa etapa.

A introdução de uma “membrana supressora”, desenvolvida, em 1981, por Stevens et al. [52], e descrita por Haddad et al. [32], capacitou o sistema a operar de modo contínuo e automatizado, reduzindo a largura do pico e propiciando um aumento da concentração do eluente que poderia ser suprimido.

Aliada a essas melhorias, uma nova geração de colunas supressoras foram comercializadas pela Metrohm e Alltech. Essas colunas possuem volumes menores do que as produzidas anteriormente, minimizando o alargamento do pico “extra coluna” e os deslocamentos nos tempos de retenção dos íons causados por efeito de exclusão de íon.

Em meados da década de 80, a CTI já utilizava suportes com partículas de 15 μm , produzindo uma eficiência de 1200 pratos [2]. O uso de partículas macroporosas foi um meio de aumentar a área de superfície dos recheios, permitindo um aumento na capacidade de troca da fase estacionária. Os leitos poliméricos iniciais eram levemente entrecruzados (5%) de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB). Com o avanço da química de polímeros, as partículas atingiram cerca de 50% de entrecruzamento, sendo compatíveis com a maioria dos solventes orgânicos utilizados em CLAE [53]. O contínuo melhoramento na química de fases

estacionárias e na tecnologia de supressão conduziu a CTI para a busca de um eluente de OH^- livre de contaminantes.

Em 1997, a Dionex introduziu no mercado um sistema eletrolítico para a geração de eluente que automatiza a produção de hidróxidos com alta pureza. No EG(40), Módulo para a Geração de Eluente, produz-se uma solução de hidróxido de potássio on-line, bombeando-se água deionizada através de uma câmara geradora de KOH e aplicando uma corrente *dc* entre o anodo e o catodo de um cartucho Elugen OH. Pela aplicação de um campo elétrico ocorre a eletrólise da água e os íons hidrônios gerados no anodo deslocam os íons potássio do eletrólito através de um conector de troca iônica. Os íons potássio neutralizam os íons hidróxidos gerados no catodo para produzir uma solução de KOH, cuja concentração é diretamente proporcional à corrente aplicada. Uma vantagem desse sistema é a geração de KOH livre de carbonato e outras impurezas dotando o sistema de um background de condutividade bastante reduzido [2, 54, 55].

1.1.5 A CTI Sem Supressão

Os métodos condutométricos que não utilizam o sistema de supressão foram publicados a partir de 1979. Gjerde et al. [56] descreveram um método alternativo para a separação e detecção de ânions inorgânicos, no qual o detector está conectado diretamente à saída da coluna analítica. A comercialização desse sistema iniciou-se primeiramente com a Wescan Company e, mais tarde, pela Waters, Shimadzu, Metrohm e outros [1-3].

Na CTI sem supressão, a abordagem depende de pequenas diferenças de condutividade entre os íons do analito e os íons da fase móvel. Para amplificar essas diferenças utilizam-se trocadores de baixa capacidade de troca, tornando possível a eluição de espécies com eluentes apresentando baixa condutância equivalente. Os eluentes mais usados são soluções com concentrações milimolares de sais de sódio ou potássio derivados de ácidos carboxílicos aromáticos, tais como os ácidos benzóico (pK_a 4,20) e ftálico (pK_{a1} 2,94 e pK_{a2} 5,41) [30]. Muitas outras soluções

de ácidos orgânicos têm sido usadas, tais como o ácido trimésico (pK_{a1} 3,10; pK_{a2} 3,90 e pK_{a3} 4,70) e o ácido piromelítico (pK_{a1} 1,80; pK_{a2} 2,80; pK_{a3} 4,50 e pK_{a4} 5,80) [39, 57]. A vantagem da utilização desses ácidos como fases móveis é por eles poderem atuar mesmo em valores de pH nos quais predomina a forma não dissociada. As etapas de dissociação ocorrem em uma faixa de pH mais ampla devido às distâncias entre os pK_a . Isso significa que a carga efetiva do ânion competidor no eluente pode ser mudada pela alteração do pH. Uma desvantagem é a sua utilização quando se deve ter um controle rígido de pH para a obtenção de tempos de retenção reprodutíveis. Tratando-se de resinas de PS-DVB, esses sais de ácidos carboxílicos têm tendência de serem fortemente adsorvidos. Esse método é um pouco menos sensível e possui uma faixa linear mais limitada do que a cromatografia de íons com coluna supressora.

1.1.6 Capacidade de Troca

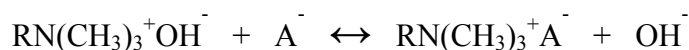
É a medida da quantidade de troca de íons que pode ocorrer entre a matriz e os íons presentes na fase móvel. A capacidade total de troca em FE baseadas em resinas é a quantidade de grupos carregados, ou potencialmente carregados, que podem ser trocados por grama de massa seca do trocador. A capacidade total é expressa em meq/g ou meq/100 mL de suspensão de resina, sendo determinada por titulação [39].

A capacidade disponível é a capacidade real do trocador sob determinadas condições. Ela é dependente de vários fatores, como a força iônica, pH e temperatura do eluente. A quantidade de amostra que pode ser aplicada em um trocador iônico depende de sua capacidade de troca, não devendo exceder a faixa de 1 a 5 % da capacidade total do trocador.

1.1.7 Mecanismo de separação

A maior parte das separações cromatográficas de íons ocorre por mecanismo de troca iônica sobre a superfície da fase estacionária carregada com grupos funcionais. Os contra-íons localizam-se nas vizinhanças dos grupos funcionais e podem ser trocados com outros íons de mesma carga na FM. Para cada íon o processo de troca é governado pelo equilíbrio de troca iônica correspondente, o qual determina a distribuição entre a FE e a FM [51].

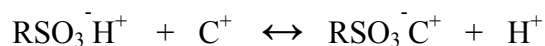
Quando um trocador de ânions, por exemplo uma amina quaternária, é colocado em contato com uma solução aquosa contendo o ânion A^- , o equilíbrio de troca que se estabelece pode ser representado pela reação [3]:



A eluição da coluna com uma solução básica diluída desloca o equilíbrio para a esquerda, fazendo com que parte dos íons A^- na fase estacionária seja transferida para a fase móvel; os íons movem-se através da coluna numa série de transferências sucessivas entre fase estacionária e fase móvel. A constante de equilíbrio K representa a afinidade da resina pelo íon A^- em relação aos íons OH^- . Quando o valor de K é alto, significa que existe uma grande tendência da fase de reter A^- . Considerando a reação de troca do ânion na resina aminada, o mecanismo é governado pela constante:

$$K = \frac{[RN(CH_3)_3^+A^-][OH^-]}{[RN(CH_3)_3^+OH^-][A^-]}$$

Analogamente, um trocador de cátions interage com o cátion C^+ , segundo a reação:



e a eluição é realizada com soluções ácidas que, similarmente, desloca o equilíbrio para a esquerda.

Para H^+ como íon de referência tem-se: íons polivalentes são mais fortemente retidos que espécies monocarregadas; para grupos de íons de mesma carga, diferenças de retenção aparecem devido ao grau de hidratação e outras propriedades. O trocador iônico prefere: íons que têm alta carga, seguido de íons que têm pequeno tamanho (quando solvatado), íons polarizáveis e, por fim, íons que têm interações fracas com a fase móvel.

1.1.8 Os Picos do Sistema em CTI

Quando uma fase móvel passa através de uma coluna cromatográfica, um equilíbrio é estabelecido entre a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM) no sistema. Se a composição da fase móvel sofre uma mudança brusca pela injeção de uma amostra ocorre uma perturbação no equilíbrio entre a FE e a FM, que se traduz em uma variação da velocidade de equilíbrio anteriormente estabelecida. Como resultado, há uma “relaxação” do sistema como um todo ou uma “atenuação” na velocidade desse sistema, até ser alcançado um novo estado de equilíbrio. Dessa forma, quando a fase móvel contém mais do que um componente, sinais adicionais, chamados de **picos de sistema**, podem aparecer. A origem desses sinais é então explicada pela perda de equilíbrio na coluna, causada pela injeção de um ou mais analitos dissolvidos em um solvente diferente daquele da fase móvel.

Esses sinais adicionais são, muitas vezes, mal interpretados por serem considerados como sinais ou picos de analitos. Muitos autores [57, 58] denominam esses sinais como: picos do sistema, picos falsos, picos fantasmas, *eingpeaks*, picos de vazio, picos induzidos ou, ainda, picos de mergulho. “Pico fantasma” parece ser o nome mais adequado devido a sua propriedade de aparecer e desaparecer, ou variar de tamanho e direção, dependendo da condição de separação a que é submetido. A realidade é que esses picos têm origem no processo cromatográfico em si ou, em

outras palavras, depende do processo que está acontecendo naquele momento e são causados por interações da fase móvel com a fase estacionária. Esse processo pode ocorrer de diferentes maneiras:

- A amostra é solvatada com um ou mais componentes da fase móvel.
- O solvente da amostra tem uma concentração diferente de um ou mais componentes da fase móvel, conduzindo a uma redistribuição desses componentes sobre a fase estacionária.
- A interação da amostra e os componentes da fase móvel adsorvidos, ou em processo de adsorção, causam a liberação desses componentes.

Para a separação cromatográfica de ânions, em um sistema sem supressão, utilizando uma solução contendo um ácido fraco como FM e detecção por condutividade sem supressão, pode-se descrever os picos de sistema como pico de injeção ou pico do sistema propriamente dito.

O pico de injeção, também chamado pico de solvente, é resultante de uma alteração no equilíbrio da coluna imediatamente após a injeção de uma amostra iônica. Quando uma solução Na^+X^- atinge a parte superior da coluna, os ânions X^- deslocam os íons (da fase móvel) que foram adsorvidos sobre os sítios da FE durante o processo de condicionamento da coluna. Esse volume de amostra contém portanto íons Na^+ e X^- , ânions da fase móvel deslocados por X^- e uma fração da própria fase móvel não ionizada. Essa alteração na composição da fase móvel gera um pico resultante de um aumento no sinal do detector. Esse pico possui algumas características próprias [38]:

- O t_R é constante em relação a variação do pH da FM e da concentração da amostra injetada.
- O sinal referente ao pico de injeção é proporcional ao volume da amostra injetada.
- A condutância do pico de injeção pode ser maior ou menor do que a condutância da FM dependendo da concentração da amostra e da composição dessa FM. O pico pode, portanto, ser positivo ou negativo.

Muitos cromatogramas mostram um *dip da água* (um pico negativo correspondendo a um soluto não retido). Esse pico tem origem na injeção de uma solução de íons em água. A água não será retida na fase estacionária e uma banda de fase móvel de uma determinada condutância será substituída por uma banda de água de condutância muito baixa causando um pico negativo e intenso [59].

Para os picos do sistema na CTI sem supressão observam-se as seguintes características [38]:

- O seu t_R depende da composição da FM e do tipo de FE utilizada.
- A altura do pico do sistema varia com o pH da FM e é dependente também da diferença entre o pH da FM e da solução da amostra.
- A altura do pico do sistema depende do volume e da concentração da amostra injetada.

Para cromatografistas que necessitam de uma compreensão mais profunda da teoria e modelos empregados para avaliação dos picos do sistema em um determinado processo, vários estudos foram feitos por Levin e Grushka [60, 61], por Guiochon, Sajonz e colaboradores [62, 63] e por Abreu e Lawrence [64].

1.2 Fases Estacionárias (FE)

A cromatografia de íons, desenvolvida inicialmente por Small [1], permite uma rápida separação e determinação quantitativa de ânions orgânicos e inorgânicos. Apesar das várias vantagens apresentadas pela cromatografia por troca iônica (catiônica e aniônica), esta ainda tem algumas limitações. Uma delas é a utilização de fases estacionárias constituídas de materiais poliméricos com tamanho de partículas grandes, resultando em colunas que apresentam baixos valores de eficiência e, conseqüentemente, picos largos, que diminuem a detectabilidade. Outra limitação é que os suportes orgânicos, geralmente, não são resistentes a altas pressões, além de aumentarem seus volumes na presença de alguns solventes

orgânicos. Apesar disso, esses suportes poliméricos possuem uma maior estabilidade química sobre uma larga faixa de pH quando comparados aos suportes de sílica [65].

A sílica, apesar de sua intensa utilização, está longe de ser um suporte perfeito. Uma das características desfavoráveis é a sua solubilidade em pH extremos. Algumas colunas com suporte de sílica, formadas por precipitação de silicatos solúveis, não devem ser utilizadas acima de pH 8 [66].

Na estrutura da sílica, os átomos de silício internos tendem a manter sua coordenação tetraédrica com o oxigênio, formando a ligação siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$).

Os silícios mais externos completam seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas, formando os chamados grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$). Esses grupos são considerados como fortes sítios de adsorção no processo cromatográfico porque interagem com moléculas bio-orgânicas ou solutos básicos, provocando adsorções que podem ser até irreversíveis [67, 68]. Esses compostos depositados na superfície podem dificultar o transporte de massa e criar outros sítios ativos não específicos. Quando a adsorção é reversível, tem-se o problema de picos largos, assimétricos e com cauda.

Os silanóis (Figura 3) podem existir na superfície nas formas: vicinal (ou ligado), geminal e livre (ou isolado). Esses grupos silanóis são responsáveis pelo caráter polar dos recheios de sílica usados em cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (CLAE-FN), na qual a fase estacionária (FE) é mais polar do que a fase móvel (FM), e também são utilizados para a modificação da superfície da sílica, permitindo obter as fases ligadas para a CLAE em fase reversa (CLAE-FR) e em cromatografia de íons (CTI).

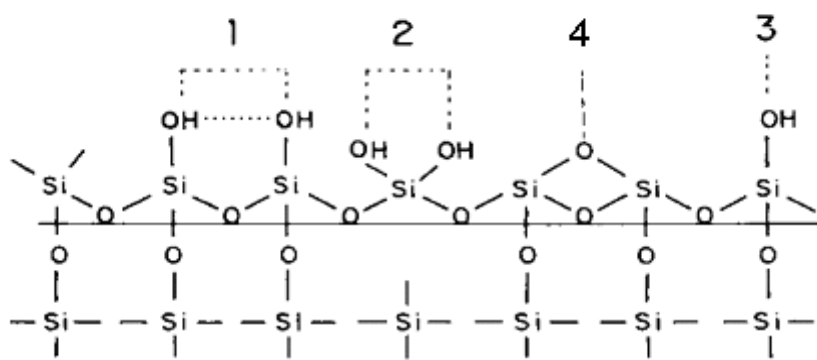


Figura 3 - Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica amorfa: (1) vicinais, (2) geminais, (3) livres e (4) siloxano superficial.

Uma das maneiras de se preparar uma fase estacionária para CTI, utilizando a sílica como suporte cromatográfico, consiste em reagir grupos silanóis do suporte com um haloorganossilano ou um organoalcoxissilano, que pode ser mono ($XSiR_3$), di (X_2SiR_2) ou trifuncional (X_3SiR), no qual X representa um halogênio, usualmente cloro, ou um alcóxido, por exemplo CH_3O^- [69], para produzir as chamadas *fases quimicamente ligadas*.

Os clorossilanos são mais utilizados do que os alcoxissilanos porque são mais reativos. Essa reatividade é mais acentuada quando se usa um catalisador, que pode ser uma base receptora de prótons. As aminas terciárias, assim como a piridina, parecem desempenhar muito bem essa função, diminuindo o tempo de reação da sílica com o respectivo agente sililante, obtendo-se um alto grau de recobrimento da superfície [70].

Independente do tipo de agente sililante utilizado, a reação de todos os grupos silanóis presentes na superfície é praticamente impossível. O grau de recobrimento geralmente não ultrapassa o valor de $4,0 \mu\text{mol m}^{-2}$, indicando que apenas 50% dos silanóis disponíveis reagem com o agente sililante. Assim, grupos reativos remanescentes permanecem na superfície da sílica e, quando hidrolizados, podem contribuir com a formação de novos silanóis residuais.

Quando se utiliza um agente sililante trifuncional, a situação é mais crítica do que quando se reage a sílica com um silano monofuncional. Nesse caso, um número maior de silanóis residuais permanece livre na superfície devido à hidrólise, que produz silanóis após a reação, e ao tamanho da molécula do agente sililante, que impede sua aproximação a todos os silanóis na superfície.

Uma alternativa para melhorar a reação é realizar essa modificação em presença de traços de umidade. As moléculas de água podem hidrolizar os grupos reativos remanescentes no reagente, produzindo novos silanóis, que podem condensar formando novas ligações siloxanos entre as cadeias do agente sililante imobilizado e também com os silanóis do suporte cromatográfico. Como resultado, tem-se uma concentração maior de grupos orgânicos do que quando se emprega condições anidras [71].

1.2.1 Sílica Modificada com Grupos Iônicos

A modificação química de sílica ou silicatos inorgânicos com um agente sililante como o 3-cloropropiltrimetoxissilano, e a funcionalização com grupamentos piridínicos já é conhecida. Para a caracterização química e física desses novos materiais, observa-se que o agente sililante é ligado covalentemente à superfície, permanecendo aderido na presença de diversos eletrólitos [72]. Para a sílica pura modificada com o 3-cloropropiltrimetoxissilano várias aplicações foram encontradas, tais como a sua utilização para a adsorção de cátions divalentes [73], uma reação subsequente com um derivado de amina aromática [74], a funcionalização com ácido glutâmico, para a formação de uma FE zwitteriônica [75] ou, ainda, a funcionalização com moléculas de benzimidazole para a concentração de íons metálicos dispersos em solução de etanol [76]. As propriedades de troca aniônica da superfície da sílica modificada com sais de piridina ligados covalentemente foi inicialmente descrita por Tundo et al. [77], cuja primeira aplicação foi como catalizador.

Gushikem e Moreira [78] estudaram a cinética de troca e a seletividade de diversos ânions adsorvidos sobre a sílica funcionalizada com o íon piridínio e utilizaram esse material como suporte para adsorção de íons metálicos de soluções aquosas e não aquosas [79-82].

Outros estudos com aplicações em eletroquímica foram realizados empregando o cloreto de propilpiridínio imobilizado sobre a superfície da sílica: como catalisador para a epoxidação de alcenos [83], como sensor potenciométrico para o íon perclorato [84], para eletrooxidação de ácido ascórbico [85] e como substrato para a imobilização de ftalocianinas tetrassulfonadas de Fe (II) ou de Co(II) para aplicação, respectivamente, como sensor de oxigênio e eletrodo para a determinação de ácido oxálico [86]. Entretanto, a utilização desse material para a aplicação como FE em separações cromatográficas por troca aniônica ainda não havia sido explorada. Essa nova aplicação é o objeto de estudo nesse trabalho.

Os tipos de fases estacionárias aniônicas que têm sido extensivamente desenvolvidas para a análise de vários ânions orgânicos e inorgânicos, que utilizam partículas de sílica como suporte são aqueles cujas superfícies são modificadas com grupos organofuncionais, ligados covalentemente [87, 88] aos grupos aminopropil [89], ou aos grupos fenilaminopropil [90].

Novas fases estacionárias foram preparadas vinculadas ao uso de material particulado de fase reversa [91], situando-se, nesse contexto, as fases estacionárias C₁₈ funcionalizada com cetiltrimetilamônio (CTA⁺), cujo grupamento atua como um sítio de troca aniônica [92, 93].

Suzuki et al. [94] prepararam uma nova FE pela ligação de 1,1,6 trimetiltetralina à sílica aminopropil através de uma ligação carbono-hidrogênio. A estrutura mostrada na Figura 4 refere-se a polieletrólitos com centros de carga de dimetilamônio interconectados por (CH₂)_x e (CH₂)_y, respectivamente, e são obtidos pela eliminação de uma molécula de H₂O de um *ionone*. Esse tipo de fase ligada possui comportamento similar à uma fase C₁₈ protegida estericamente. Isso sugere que os sítios de silanóis ácidos são protegidos por esses polieletrólitos e não

contribuem para o processo de separação dos analitos. Empregando-se FM aquosa de hidrogenoftalato de potássio, é possível separar-se diversos ânions, pois esse trocador exibe um padrão de seletividade de uma FE para CTI com grupos de amônio quaternário ligados.

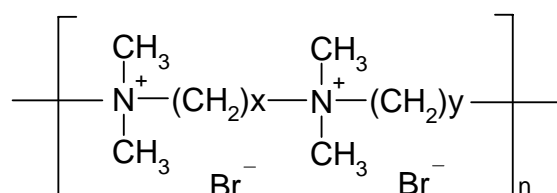


Figura 4 - Polieletrólitos com centros de carga de dimetilamônio

Recentemente, uma nova FE para troca aniônica foi sintetizada através da silanização da sílica com cloropropiltrimetoxissilano, seguida pela reação com N-metilimidazol. Essa fase é de troca iônica, mas possui mecanismo de fase reversa aplicável não apenas à separação de ânions, mas também à separação de aminoácidos e proteínas [95].

1.2.2 Fases Estacionárias Poliméricas

Um trocador iônico compreende três elementos importantes: uma matriz insolúvel que pode ser orgânica ou inorgânica, natural ou sintética, sítios iônicos fixos e uma quantidade equivalente de íons de carga oposta àquelas fixadas nos sítios. Os grupos fixados são referidos como grupos funcionais e os íons associados (que estão próximos) são chamados de contra-íons. [17].

Os trocadores iônicos a base de resina, para serem aplicados em CI, devem ter algumas propriedades fundamentais, tais como a habilidade de trocar os íons com rapidez, boa estabilidade química em uma faixa ampla de valores de pH e resistência à deformação durante o recheio da coluna quando são expostos à vazão da FM [1].

As resinas de troca iônica de baixa capacidade de troca, produzidas por derivação química de polímeros orgânicos sintéticos, foram introduzidas

inicialmente como fases estacionárias em CI sem supressão por Gjerde, et al. em 1979 [56]. A maioria das resinas de troca iônica são produzidas de copolímeros de estireno e divinilbenzeno com um pequeno número consistindo de copolímeros de divinilbenzeno e ácido acrílico ou ácido metaacrílico. No copolímero de estireno-divinilbenzeno (PS-DVS) o estireno é entrecruzado com divinilbenzeno em uma rede polimérica de acordo com o esquema da reação mostrado na Figura 5:

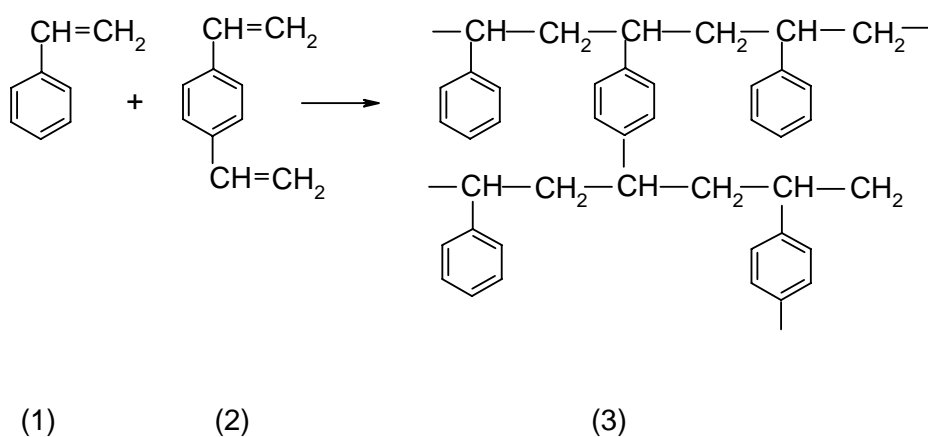


Figura 5 - Reação do estireno (1) com divinilbenzeno (2) para produzir copolímeros de estireno-divinilbenzeno (3).

As unidades divinilbenzeno estabelecem uniões com outras cadeias. O grau de ligações cruzadas é dado pela quantidade de divinilbenzeno presente na mistura e porcentagens típicas são de 1, 2, 4, 8, 12 e 16. A porosidade do material é consequência desse grau de ligações cruzadas [17].

Um trocador de cátions ou de ânions é obtido pela introdução de grupos funcionais na superfície da resina. As resinas básicas (trocadores aniônicos) são preparadas por clorometilação do anel benzênico seguida por uma reação com uma amina terciária de uma outra espécie adequada a esse fim. As resinas ácidas (trocadores catiônicos) são preparadas por sulfonação do anel benzênico com ácido sulfúrico concentrado ou com ácido clorossulfúrico. As várias espécies de grupamento, bem como o processo de obtenção são descritos em várias referências

clássicas de troca iônica e CI [17].

A reação do ácido metaacrílico com divinilbenzeno para produzir a resina de polimetacrilato entrecruzado é mostrada na Figura 6:

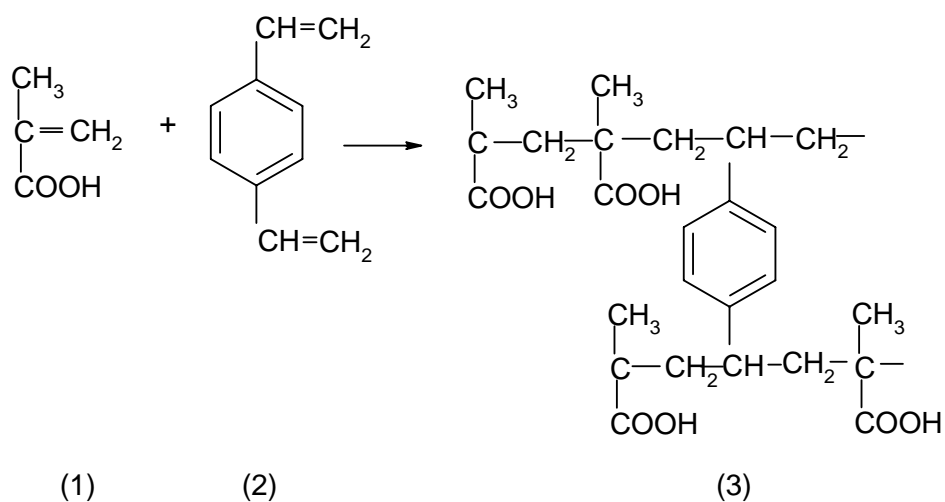


Figura 6 - Reação do ácido metaacrílico (1) com o divinilbenzeno (2) para produzir o copolímero metacrilato-divinilbenzeno (3).

Novas fases estacionárias poliméricas utilizadas em Cromatografia de Íons são constituídas de partículas de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), circundada por uma monocamada de partículas de látex carregadas [1, 15, 33, 39]. O uso de um substrato de etileno-vinilbenzeno (EVB) entrecruzado com 55% de divinilbenzeno (DVB) resultou em materiais compatíveis com diversos solventes. O látex é usualmente cloreto de vinilbenzila-divinilbenzeno (VBC-DVB) ou PS-DVB (poliestireno-divinilbenzeno) incorporando diferentes grupos funcionais.

Uma outra espécie de resina aniônica é o látex baseado em metacrilato, no qual monômeros de glicildimetacrilato (GMA) são entrecruzados com dimetacrilato

de etileno glicol (EDM) [96]. Os trocadores aniônicos contêm grupos funcionais de amina quaternária derivada de alquil ou de aril. As diferenças na seletividade entre os trocadores aniônicos VBC-DVB e GMA-EDM aparecem principalmente na separação de ânions mais polarizáveis, tais como iodeto e tiocianato [97].

A evolução das FE na CI de ânions pode ser monitorada pela série de colunas comercializadas direcionadas à análise de amostras de águas naturais. A IonPac AS9HC da Dionex, recheada com partículas macroporosas de EVB-DVB entrecruzada 55% e revestida com um látex de glicidoxietilmetacrilato, possui o diferencial de uma melhor resolução para o fluoreto em relação ao *dip da água*. Uma nova FE para troca aniônica comercializada pela Dionex, denominada IonPac AS14A, foi desenvolvida utilizando-se uma nova técnica de enxerto em bloco (block-grafting, em inglês) [98]. Essa coluna é adequada ao uso em uma faixa ampla de pH.

Um outro trabalho de importância para a separação de ânions foi o desenvolvimento por Woodruff et al. [99] de uma FE de criptato, que consiste em um substrato macroporoso polimérico de estireno-divinilbenzeno, com 55% de entrecruzamento com um tamanho médio de poro de 15 nm e uma área de superfície de 450 m². O criptato 2,2,2 n-decil é então ligado covalentemente sobre a superfície da resina macroporosa ou de um suporte de sílica C₁₈.

Recentemente, Sarzanini [36] fez uma revisão cuidadosa das fases estacionárias desenvolvidas e disponibilizadas no mercado para aplicação em Cromatografia de Íons.

1.2.3 Fases Estacionárias Monolíticas para CI

As fases estacionárias monolíticas, também conhecidas como FE de leito contínuo, têm despertado grande interesse como resultado das vantagens que apresentam em relação as FE de recheios convencionais. As fases estacionárias monolíticas podem ser divididas em dois grupos principais: os monolitos de sílica

(inorgânicos) e os monolitos de polímeros rígidos (orgânicos).

FE poliméricas monolíticas produzidas de metacrilato e funcionalizadas com amônio quaternário foram sintetizadas para aplicação em Eletrocromatografia Capilar e micro CTI para determinar a concentração de ânions inorgânicos [100,101].

As colunas monolíticas a base de sílica foram desenvolvidas no final da década de noventa, sendo do tipo C₈ ou C₁₈ e estão disponíveis comercialmente desde 2000 com o nome de Chromolith Columns. O recheio das colunas monolíticas de sílica também é um material poroso, mas apresenta poros com diferentes tamanhos. Nas colunas convencionais, o material particulado apresenta mesoporos com tamanho de 6 até 30 nm, enquanto que, na fase monolítica, o suporte cromatográfico apresenta estrutura com mesoporos de 13 nm e macroporos de 2 µm de diâmetro [70].

Grande sucesso foi obtido na preparação de novas fases estacionárias vinculadas ao uso de colunas monolíticas baseadas em sílica recoberta com sais de amônio quaternário, as quais resultaram em separações ultra-rápidas de alguns ânions inorgânicos mais comuns [102, 103].

Paull e Nesterenko [104], em uma revisão recente, mostraram o “estado da arte” dos novos desenvolvimentos e as diferentes aplicações das FE monolíticas à base de sílica. Entretanto, o número de fases estacionárias monolíticas para troca aniônica, utilizando suporte de sílica, é ainda muito limitado. A maioria das colunas monolíticas disponíveis comercialmente são baseadas em polímeros, incluindo polimetacrilato, poli(estireno-divinilbenzeno), poliacrilamida e celulose. A preparação desses materiais, com a introdução de grupos funcionais, é mais simples, mas possui a desvantagem de um possível inchamento e retração do monolito sob diferentes condições de FM [101].

1.2.4 Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária

1.2.4.1 Escolha do Processo de Enchimento – Definição de Algumas Variáveis

Na década de 80, o enchimento das colunas era descrito como uma arte, uma vez que dificilmente se conseguia uma reprodutibilidade dos métodos utilizados na época. Após este período, houve um grande desenvolvimento na tecnologia de produção de colunas cromatográficas e a reprodutibilidade das respostas desses materiais em relação ao enchimento e a parâmetros inerentes a separação deixaram de ser um problema, mas esse avanço tecnológico ainda é pouco divulgado para os usuários da Cromatografia [105].

Alguns fatores são fundamentais para um bom desempenho cromatográfico, tais como a viscosidade e as propriedades dispersivas dos solventes de suspensão, a pressão de enchimento, o polimento das paredes internas dos tubos, entre outros [106, 107]. Para o enchimento das colunas cromatográficas existem variáveis importantes na escolha do processo. São elas:

- A direção do enchimento;
- O tipo de solvente utilizado na preparação da suspensão da FE;
- A densidade e a viscosidade do solvente definido para a suspensão;
- A pressão utilizada durante o enchimento;
- O solvente usado como propulsor durante o procedimento de enchimento;
- A forma de agitação da suspensão.

Os métodos para enchimento de colunas podem ser classificados pela forma na qual a fase estacionária é introduzida no tubo. Para partículas de FE de tamanho menor que 20 μm utiliza-se normalmente no modo descendente o método de enchimento por suspensão à alta pressão [108].

Diante da literatura existente sobre o tema, observa-se que há controvérsias a respeito da utilização das diversas técnicas, o que conduz a cada grupo que segue essa linha de pesquisa a fazer sua própria adaptação, dependendo do tipo de enchimento a ser realizado. No Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida da Unicamp (LabCrom) a escolha de um processo adequado de enchimento e a implementação do mesmo, aconteceu ao longo dos anos 1980 e 1990. As aplicações desse procedimento de enchimento bem como a evolução de suas melhorias foram relatadas em muitos estudos realizados por pesquisadores desse laboratório [106, 109-118].

1.2.4.2 Parâmetros Cromatográficos

Quando uma coluna é nova, seja ela adquirida comercialmente ou através de enchimento no próprio laboratório, devem ser feitos cálculos dos parâmetros cromatográficos, a fim de avaliar o potencial dessa coluna para futuras separações cromatográficas. Esses cálculos são realizados com os dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como mostra a Figura 7.

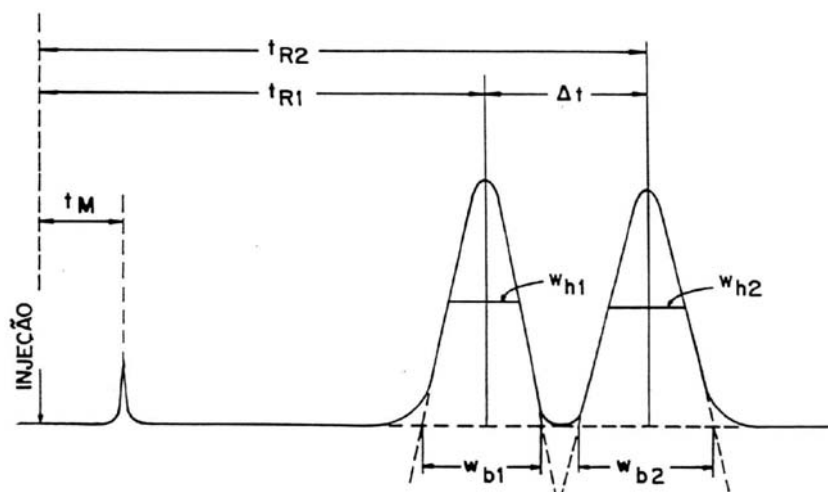


Figura 7 - Cromatograma obtido na separação de uma mistura de dois componentes [17].

O tempo de retenção do analito, t_R , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção máxima do pico. O tempo de retenção de um composto não retido, t_M , é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a saída da coluna e representa o tempo gasto para a fase móvel fazer este percurso. Esses valores são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem um integrador ou *softwares* apropriados. O tempo de retenção ajustado, t'_R , é o tempo real que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado por:

$$t'_R = t_R - t_M$$

O fator de retenção, k , é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna através da fase móvel. Valores de $2 < k < 10$ são considerados ideais mas aceita-se $1 < k < 20$ [22, 24].

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

A resolução, R_s , é a medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a equação:

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

onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção de dois analitos, w_{b1} e w_{b2} são as larguras dos respectivos picos na linha de base e w_{h1} e w_{h2} são as larguras dos picos a meia altura, com a largura medida em unidades de tempo.

O fator de separação, α , entre dois picos adjacentes é calculada pela razão entre k_2 (do soluto mais retido) e k_1 (do soluto menos retido):

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

A eficiência, medida pelo número de pratos, **N**, representa o número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da equação:

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W_b} \right]^2 = 5,545 \left[\frac{t_R}{W_h} \right]^2$$

A altura do prato, **H**, é a razão entre o comprimento (L) da coluna expressa em mm e o número de pratos (N), que pode ser calculado por:

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

Um outro parâmetro que deve ser considerado é a altura do prato reduzido, **h**. Esse parâmetro é um número adimensional calculado pelo quociente da altura do prato e o diâmetro médio das partículas que compõe a fase estacionária (**h** = H/dp). É útil para comparar colunas recheadas com partículas de tamanhos diferentes [22].

A simetria dos picos é avaliada pelo fator de assimetria (As), que é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido horizontal a 10 % da sua altura. Segundo Snyder et al. [119], os valores de As devem estar entre 0,95 e 1,3, sendo admitido valores de até 1,5. Outra maneira de definir a forma do pico é através do fator de alargamento (TF) a 5 % da sua altura. Nessa abordagem a assimetria é medida a 5 % da altura do pico [119]. A Figura 8 mostra como é calculada a assimetria utilizando as duas maneiras.

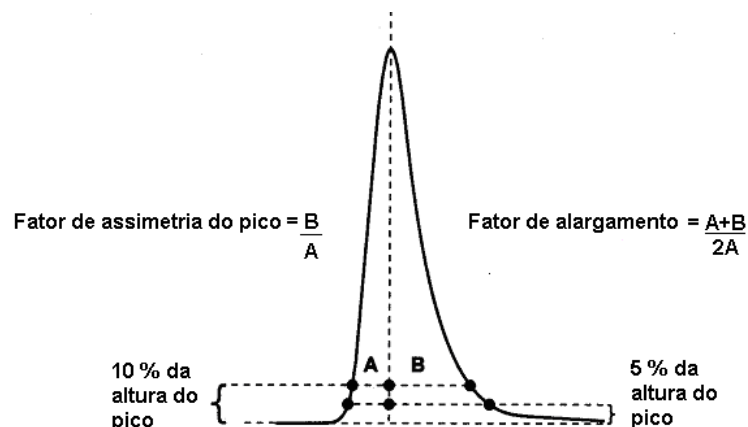


Figura 8 - Determinação do fator de assimetria e alargamento do pico [119].

A vazão (F) ótima de trabalho de uma coluna pode ser determinada através da equação de van Deemter:

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

sendo μ a velocidade linear da FM, obtida pela equação:

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

O termo A, difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Esse termo pode ser minimizado, usando colunas com diâmetro interno reduzido bem recheadas com partículas de tamanho pequeno e uniforme.

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

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

A figura 9 ilustra uma curva típica da equação de van Deemter, assim como a contribuição de todos os termos da sua equação [17]. A curva mostra que existe uma vazão (F) ótima que está relacionada com a velocidade linear da fase móvel (μ), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, correspondendo ao valor máximo de eficiência da coluna.

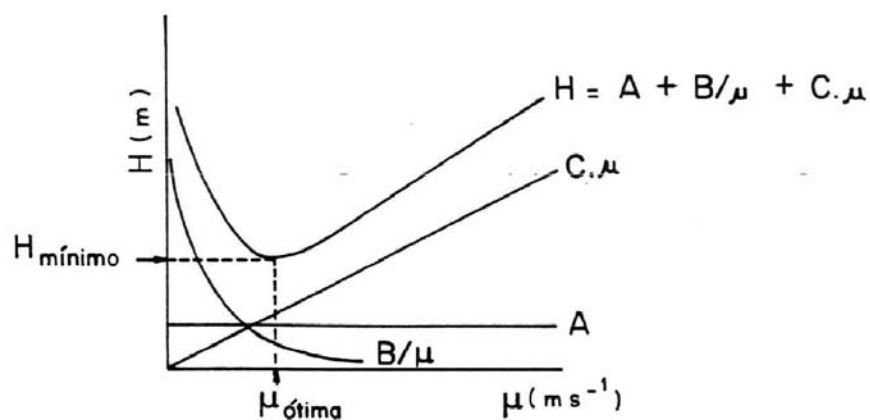


Figura 9 - Curvas da equação de van Deemter.[17]

1.3 Determinação da Capacidade de Troca

A capacidade de troca da sílica funcionalizada com o íon piridínio é um outro parâmetro importante a ser determinado. Gushiken e colaboradores [78-80, 86], determinaram o grau de funcionalização da sílica modificada, tratando o material sólido com solução de HNO_3 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e após quantificando o íon cloreto liberado na solução por titulação potenciométrica com AgNO_3 . Neste trabalho, utilizou-se a análise por ativação neutrônica, que consiste em uma técnica analítica alternativa bastante adequada por apresentar uma excelente detectabilidade e seletividade para a quantificação do íon cloreto. Devido a essa detectabilidade são necessários apenas alguns miligramas do material sintetizado para a irradiação, sendo uma grande vantagem no caso de amostras preciosas ou de difícil obtenção.

1.3.1 A Técnica

A técnica de análise por ativação neutrônica (AAN) consiste na indução de radioatividade em uma amostra e a posterior detecção e quantificação dessa radioatividade induzida. Um modo de induzir a radioatividade é através da irradiação da amostra com nêutrons (n) em um reator nuclear, ocorrendo a reação (n, γ). Os radionuclídeos formados decaem em tempos de meia-vida e com emissões gama características. A medida dessa radiação gama, via espectrometria gama, permite, então, a identificação e quantificação dos diversos elementos ativados na amostra [120].

No caso da técnica ser puramente instrumental significa que a amostra é irradiada sem preparo químico prévio, como, por exemplo, a dissolução ácida da amostra. Considera-se esse ponto como uma vantagem, pois não há perda de constituinte da amostra devido a possíveis reações químicas durante o preparo. Além disso, não há contaminação proveniente de reagentes químicos e nem há qualquer outra alteração da composição química do material.

1.3.2 Reator TRIGA MARK I IPR-R1

O reator do tipo TRIGA (Training, Research and Isotope-General Atomic), que utiliza os fluxos de nêutrons gerados para produção de radioisótopos, análise por ativação, neutrongrafia, produção de radiofármacos, dentre outros, está em operação desde novembro de 1960. Situado em Belo Horizonte, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Instituto da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), esse reator usa urânio enriquecido a 20 % como combustível, hidreto de zircônio como moderador de nêutrons, grafite como refletor de nêutrons e água leve desmineralizada como refrigerante. O reator de pesquisas TRIGA MARK I IPR-R1 apresenta três dispositivos para as irradiações: mesa giratória, tubo central e tubo pneumático. A mesa giratória é especialmente apropriada para análises por ativação neutrônica, apresentando fluxos de nêutrons

estáveis e 40 posições para irradiação de amostras na camada inferior e mais 40 na camada superior [121].

1.3.3 Método k_0 de Ativação Neutrônica Instrumental

No CDTN/CNEN, o método de ativação neutrônica instrumental mais utilizado é o método k_0 , no qual as amostras irradiadas são acompanhadas de comparador/monitor de fluxo e os cálculos são efetuados considerando os parâmetros f e α do reator e as constantes nucleares dos elementos. O parâmetro f é a razão entre os fluxos térmico e epitérmico e α é a medida do afastamento do fluxo epitérmico real da curva ideal [122-124].

No método k_0 de ativação neutrônica instrumental (k_0 -ANI), um ou dois comparadores são irradiados em paralelo à amostra para o cálculo da atividade específica. O cálculo da concentração do elemento de interesse é baseado na atividade obtida do comparador. Os dados nucleares não conhecidos são substituídos por constantes nucleares características de cada radionuclídeo chamadas assim de k_0 . Dessa forma, o método requer um bom conhecimento dos parâmetros espectrais do fluxo de nêutrons no canal de irradiação do reator.

A equação abaixo,

$$m_a = \frac{m_p C_{n,a} \epsilon_p F S_p C_a D_a H_a}{k_0 C_{n,p} \epsilon_a F_a S_a C_p D_p H_p}$$

expressa k_0 como uma constante natural dos isótopos em estudo, podendo ser calculada a partir de seus componentes. O método k_0 combina a simplicidade experimental dos métodos absolutos por ativação neutrônica com a exatidão dos métodos comparativos. É aplicada para se calcular a massa do i -ésimo elemento presente na amostra [123, 124]. Desta equação K_0 é definido como:

$$k_0 = \frac{M_p \theta_a P_{\gamma,a} \sigma_{0,a}}{M_a \theta_p P_{\gamma,p} \sigma_{0,p}}$$

Considerando os índices a , referindo-se à amostra, e p ao padrão, tem-se nessas equações que: m é a massa do elemento analisado, C_n a área líquida sob o pico gama do radionuclídeo de interesse, ε a eficiência do detector para o gama considerado, F é $[f + Q_0(\alpha)]$, onde f é a razão entre os fluxos de nêutrons térmico e o epitérmico, definido a partir de uma determinada energia e $Q_0(\alpha)$ a razão entre o $I_0(\alpha)$, integral de ressonância, S o fator de saturação de irradiação em função do tempo de irradiação, C o fator de correção de decaimento do radionuclídeo durante a contagem, D o fator de correção de decaimento do radionuclídeo entre o final de irradiação e o início da contagem, H é o tempo morto do detector durante a contagem, M é a massa atômica do elemento, sendo quantificado, θ é a abundância isotópica do elemento, P_γ a abundância absoluta medida e σ_0 a secção de choque a nêutrons térmicos. Para 91 isótopos de interesse, os valores de k_0 têm sido medidos por diversos laboratórios em todo o mundo, sendo que os recomendados estão disponíveis na literatura com incertezas menores que 2 %. Para outros 21, a incerteza está na faixa de 5 % [123].

Durante os trabalhos de ativação neutrônica utilizando o método k_0 , são irradiados três padrões de sódio (Na) de 1000 μg cada para serem utilizados como mono-padrões comparadores. A escolha do elemento sódio deve-se a várias razões:

- Geração de um radioisótopo que apresenta uma meia-vida relativamente pequena, não produzindo rejeitos radioativos significantes;
- Possibilidade de utilização em análise de elementos de meia-vida curta, média e longa;
- Baixo custo;
- Disponibilidade de padrões de boa qualidade no mercado.

2. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de um novo material para ser utilizado como fase estacionária em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), modo troca aniônica, baseado na modificação da superfície da sílica com um agente sililante e posterior reação com piridina. Esta fase estacionária deve ser capaz de separar uma mistura de ânions orgânicos e inorgânicos com eficiência.

2.1 Etapas do Trabalho

Para atingir o objetivo delineado as etapas do trabalho são as seguintes:

- Modificar a superfície de uma sílica cromatográfica com um agente sililante e posterior reação com a piridina para produzir a sílica propilpiridínio, sendo essa modificação realizada em meio anidro ou em presença de água.
- Caracterizar as sílicas modificadas por meio de testes físicos, químicos e cromatográficos.
- Quantificar a capacidade de troca iônica das sílicas funcionalizadas.
- Empregar esses materiais como fases estacionárias no recheio de colunas cromatográficas utilizadas em cromatografia por troca aniônica.
- Verificar as separações cromatográficas de misturas contendo ânions orgânicos e inorgânicos.
- Determinar a estabilidade química da fase estacionária desenvolvida.
- Utilizar a fase estacionária desenvolvida para a quantificação de alguns ânions contaminantes no meio ambiente.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

- Agitador magnético, Corning.
- Agitador Red Rotor, Hoefer Pharmacia Biotech Inc.
- Agitador Roto-torque, Cole-Parmer.
- Analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400 (IQ-UNICAMP).
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments modelo 2050, (IQ-UNICAMP).
- Balança analítica Fisher Scientific, modelo A-250.
- Bomba de enchimento Haskel com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1000 a 50000 psi), modelo 51769 (LABCROM).
- Cromatógrafo a líquido, Waters (LABCROM) utilizado nas separações em fase normal, consistindo dos seguintes componentes:
 - Bomba de alta pressão, Waters, modelo 510.
 - Detector espectrofotométrico UV/Vis de comprimento de onda variável, Waters, modelo 486.
 - Injetor Rheodyne com alça amostradora de 5 μ L, modelo 7125.
 - Software Chrom Perfect da Justice Innovation.
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu (CDTN) utilizado nas separações por troca iônica, consistindo dos seguintes componentes:
 - Bomba de alta pressão tipo pistão recíproca, cabeça dupla, modelo LC-10AD_{VP}.
 - Forno para coluna com controle de temperatura na faixa de 4 a 80 °C em intervalos de um °C, modelo CTO-10AD_{VP}.

- Detector de condutividade CDD-6A, com volume de célula de 0,25 μL .
- Injetor Rheodyne com alça amostradora de 20 μL , modelo 725.
- Software Class-LC10 para cromatógrafo a líquido da série LC-10A.
- Espectrofotômetro de Absorção no Infravermelho com intervalo de 4000 – 400 cm^{-1} , resolução de quatro cm^{-1} , Bomem, modelo MB (IQ-UNICAMP).
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear com polarização cruzada segundo rotação em um ângulo mágico (CP-MAS-NMR), Bruker AC 300.
- Medidor de área superficial (BET), Micromeritics, modelo Flowsorb 2300 (IQ-UNICAMP).
- pHmetro Metrohm, modelo 744 (CDTN).
- Sistema purificador de água, Millipore, modelo Milli Q-Plus (CDTN).

3.2 Materiais

3.2.1 Reagentes e Solventes

- Acetonitrila, OmniSolv, EMDTM.
- Ácido 4-hidroxibenzóico para síntese, Merck.
- Ácido ftálico (1, 2 ácido benzenodicarboxílico), p.a., Merck.
- Água deionizada, Sistema Milli-Q Plus.
- Amostra de Referência CRM 409 (Certified Reference Material) – Community Bureau of Reference – BCR, Bélgica.
- Amostra de Referência CRM 408 (Certified Reference Material) – Community Bureau of Reference – BCR, Bélgica.
- Citrato de sódio tribásico diidratado, Reag. ACS, Reag ISO, Reag Ph. Eur. – Riedel – De Haën.

- Clorofórmio, p.a., Merck.
- (3-cloropropil)trimetoxissilano 97%, Aldrich.
- Diclorometano, p.a., Merck.
- Hexano, p.a., Merck.
- Hexano, grau HPLC, Tedia.
- Metanol, OmniSolv, EMD™.
- Piridina, Aldrich.
- Sílica Davisil, tamanho das partículas: 10 μ m; forma irregular; área superficial; (263 \pm 8) m² g⁻¹; tamanho de poro: 15nm; volume de poro:60,5cm³ g⁻¹; fornecedor: Alltech, LOTE 1 –Nº de estoque 1445.
- Solução padrão de cloreto – CertiPUR – NaCl em H₂O, (1001 \pm 2) mg L⁻¹ de Cl⁻, Merck.
- Solução padrão de nitrito-CertiPUR – NaNO₂ em H₂O, (998 \pm 5) mg L⁻¹ de NO₂⁻, Merck.
- Solução padrão de nitrato – CertiPUR – NaNO₃ em H₂O, (1003 \pm 5) mg L⁻¹ de NO₃⁻, Merck.
- Solução padrão de brometo – CertiPUR – NaBr em H₂O, (999 \pm 2) mg L⁻¹ de Br⁻, Merck.
- Solução padrão de sulfato – CertiPUR – Na₂SO₄ em H₂O, (1001 \pm 2) mg L⁻¹ de SO₄²⁻, Merck.
- Tris(hidroximetil)aminometano, TRIS, p.a., Merck.
- Tolueno, p.a., Merck.

3.2.2 Coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas utilizadas neste trabalho foram confeccionadas na oficina mecânica da UNICAMP a partir de tubos de aço inoxidável 316 L, sem costura. Esse material é conveniente para ser empregado na fabricação de colunas

cromatográficas utilizadas em CLAE, pois possui elevada resistência mecânica para suportar altas pressões.

Nos experimentos para verificar o comportamento da fase estacionária frente a mudanças de pH e no teste de estabilidade foram utilizadas colunas de 60 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno. Para as separações cromatográficas dos diversos ânions testados, envolvendo a otimização da metodologia e sua posterior aplicação, foram utilizadas colunas de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno.

Após a confecção, o processo de polimento interno das colunas cromatográficas é fundamental para a eliminação de imperfeições, uma vez que esses materiais são adquiridos com uma superfície interna bastante irregular, as quais podem oferecer resistência ao escoamento da fase móvel, diminuindo a eficiência da coluna. O processo de polimento seguiu uma metodologia desenvolvida no LabCrom [109]. As partes constituintes da coluna cromatográfica são mostradas na Figura 10.

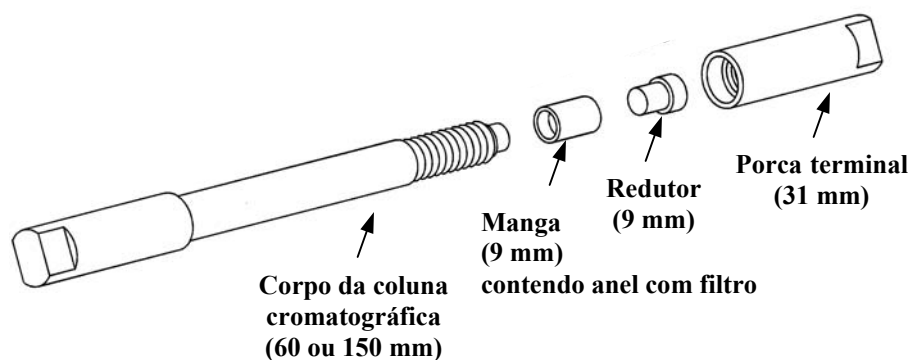


Figura 10 - Esquema de uma coluna cromatográfica e suas conexões.

3.3 Preparação da Fase Estacionária (FE)

3.3.1 Etapa 1: Modificação Química da Superfície da Sílica com o Agente Sililante

Nos processos de modificação química utilizou-se uma sílica da marca Davisil, forma irregular, tamanho de partícula de 10 μm , tamanho de poros de 15 nm. Duas sínteses foram feitas: na primeira, a reação foi efetuada em meio anidro, utilizando-se 10 g de sílica. Na segunda, foram utilizadas 20 g de sílica, com adição de pequena quantidade de água para promover a polimerização do trialcóxissilano. Nas duas sínteses, os procedimentos operacionais e os reagentes utilizados foram os mesmos, diferindo, uma da outra, apenas no meio reacional.

Inicialmente, a sílica foi seca, sob vácuo, à temperatura de 100 °C por 6 h, para remoção da umidade. Após o resfriamento até a temperatura ambiente em dessecador, uma massa de 10 g ou 20 g foi transferida para um balão de reação, contendo, respectivamente, 100 ou 250 mL de tolueno. A suspensão foi agitada mecanicamente e, durante este processo, adicionou-se o 3-cloropropiltrimetoxissilano, seguido da trietilamina, como catalisador [125]. O agente sililante foi adicionado em excesso, correspondendo, respectivamente, a 20 e 40 mL para 10 e 20 g de sílica, de forma a garantir um maior recobrimento da superfície. A quantidade de silano adicionado na reação, o cloropropiltrimetoxissilano, foi determinada com base na concentração teórica de silanóis (α_{SiOH}) presentes na superfície da sílica disponíveis para reagir com o silano em questão, segundo a equação:

$$\text{Conc}_{\text{OH}^-} (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ sílica}) = S_{\text{BET}} (\text{m}^2 \text{ g}^{-1}) \times \alpha_{\text{SiOH}} (\mu\text{mol m}^{-2})$$

onde S_{BET} ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$) corresponde à área de superfície da sílica, $\text{Conc}_{\text{OH}^-}$, à concentração total de silanóis disponíveis na superfície da sílica ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ sílica}$), considerando a quantidade total do material utilizado na síntese, e α_{SiOH} igual a 8,0

$\mu\text{mol m}^{-2}$, correspondendo a 4,8 silanóis / nm^{-2} [126]. Também é possível determinar o volume do agente sililante necessário para reagir com os silanóis da superfície da sílica, considerando-se a massa molar (M) do silano e o valor de sua densidade (d), de tal forma que:

$$m_{\text{silano}} = \text{Conc}_{\text{OH}^-} \times M_{\text{silano}}$$

$$V_{\text{silano}} = \frac{m_{\text{silano}}}{d_{\text{silano}}}$$

Para a produção da sílica modificada em presença de água, antes da reação com o 3-cloropropiltrimetoxissilano, foram adicionadas 700 μL de água deionizada. A reação foi processada em um balão de três bocas e realizada sob refluxo em atmosfera de nitrogênio por 48 h, conforme mostrado na Figura 11.



Figura 11 - Sistema utilizado para as duas etapas da síntese.

Nesse processo, o nitrogênio foi borbulhado através da glicerina para monitorar o fluxo, sendo então purgado para o interior do balão que continha a sílica

em reação. Após o término da reação, o material foi resfriado à temperatura ambiente, adicionando-se então 100 mL de tolueno para a remoção do excesso de silano, que não reagiu.

O produto da reação foi transferido para um sistema de filtração a vácuo e lavado na seqüência: 100 mL de tolueno, 100 mL de isopropanol, 100 mL de etanol, 200 mL da mistura etanol:água, modificando-se lentamente a polaridade com uma primeira adição dessa mistura na proporção 40:60 (v/v) e uma segunda adição, na proporção 30:70 (v/v). Finalmente, lavou-se com 500 mL de água deionizada e após, com 100 mL de metanol. A sílica cloropropil, identificada como **SilprCl**, foi seca sob vácuo, a temperatura de 60 °C por 4 h, antes da reação com piridina.

3.3.2 Etapa 2: Preparação da Sílica Propilpiridínio (SilprPi)

Em uma segunda etapa, as sílicas SilprCl, referentes às sínteses realizadas em meio anidro e em presença de água, foram transferidas para balões contendo, respectivamente, 100 e 250 mL de tolueno. Após a homogeneização da mistura, adicionou-se 10 ou 20 mL de piridina (um grande excesso), para o meio anidro e em presença de água, respectivamente. O sistema foi mantido em refluxo, com atmosfera inerte de N₂ por 72 h, sob agitação mecânica constante. O sólido resultante foi filtrado sob vácuo, sendo lavado primeiramente com 500 mL de metanol, 300 mL de água deionizada e novamente com 200 mL de metanol. A sílica propilpiridínio foi seca sob vácuo, à temperatura ambiente. Esses materiais funcionalizados, obtidos a partir da sílica cloropropil, foram identificados como sílica propilpiridínio, SilprPi e sílica propilpiridínio preparada na presença de H₂O, SilprPi-H₂O.

3.4 Caracterização Física e Química da Fase Estacionária

As amostras de sílica pura e de sílicas modificadas foram caracterizadas utilizando as seguintes técnicas:

3.4.1 Análise Elementar

As sílicas modificadas com o alcoxissilano (SilprCl e SilprCl-H₂O) e as sílicas funcionalizadas com o íon piridínio (SilprPi e SilprPi-H₂O) foram submetidas à análise elementar, sendo as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio determinadas no analisador 2400 da Perkin Elmer.

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio consiste em converter os elementos da amostra em gases simples como CO₂, H₂O e N₂, pelo método da combustão. A amostra é primeiramente oxidada em uma atmosfera de oxigênio puro. Os produtos gerados na zona de combustão incluem CO₂, H₂O e N₂. Os elementos como os halogênios e enxofre são removidos por reagentes na zona de combustão. Os gases resultantes são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume e então despressurizados através da coluna, separados e detectados em função de suas condutividades térmicas, e convertidos em porcentagem de C, H e N na amostra [127].

3.4.2 Análise Termogravimétrica

A termogravimetria foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica da sílica modificada após a silanização com os alcoxissilanos (SilprCl) e as sílicas funcionalizadas com o íon piridínio (SilprPi e SilprPi-H₂O). Para este fim, 10 mg de amostra foram pesadas e colocadas no analisador térmico. As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio com velocidade de aquecimento constante de 10 °C min⁻¹, iniciando-se na temperatura de 25 °C até 1000 °C. Foram gerados dados de perda de massa da amostra, com o aumento da temperatura.

3.4.3 Medida de Área Superficial

Para as medidas de área superficial, volume e tamanho de poros da sílica das duas sínteses realizadas, sílicas cloropropil e cloropropilpiridínio, foi empregado o método BET (Brunauer, Emmett e Teller), que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido à diferentes pressões na temperatura do nitrogênio líquido, em 77 K, utilizando o equipamento Micromeritics Flowsorb 2300 .

3.4.4 Espectroscopia no Infravermelho

A sílica pura e as sílicas sintetizadas, SilprCl, SilprCl-H₂O, SilprPi e SilprPi-H₂O, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho (IV). Para obtenção dos espectros foi utilizado o acessório de reflectância difusa. Neste dispositivo as amostras, na forma de pó, são colocadas sobre o porta amostra sem a adição do KBr. Os espectros na região do IV, no instrumento Bomem, foram obtidos no intervalo de 4000 a 450 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹.

3.4.5 Ressonância Magnética Nuclear de ²⁹Si e ¹³C

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ²⁹Si e ¹³C para as sílicas sintetizadas, SilprCl e SilprPi, foram obtidos utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico CP/MAS. Para o núcleo de ²⁹Si foi usado um tempo de contacto de 5 ms e um intervalo de tempo de 3 s e para o ¹³C, um tempo de contacto de 3 ms e um intervalo de 3 s. As análises foram realizadas, utilizando a frequência de 75,5 e 59,6 MHz para carbono e silício, respectivamente.

3.4.6 Determinação da Capacidade de Troca pela Técnica de Ativação Neutrônica

3.4.6.1 Preparo da Amostra

O grau de funcionalização da sílica sintetizada, SilprPi, foi determinado através da troca dos contra-íons Cl^- pelos íons NO_3^- . Foram utilizadas amostras de SilprPi preparadas em meio anidro e em presença de água. A troca aniônica foi efetuada adicionando-se 10 mL de HNO_3 0,1 mol L^{-1} a 0,1 g desse material, sob agitação constante, por 1 h. Após a agitação, a amostra em solução de HNO_3 permaneceu em repouso por 12 h. Em seguida, pipetou-se uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante para a determinação da concentração dos íons cloreto. Este mesmo procedimento também foi realizado utilizando-se uma solução de KNO_3 0,1 mol L^{-1} , com pH ajustado em 4,2, como meio de troca. O valor do pH foi ajustado ao mesmo valor do tampão utilizado para a separação cromatográfica dos ânions. Em todos os experimentos as amostras foram preparadas em duplicatas. As alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para tubos de polietileno que, uma vez lacrados, foram inseridos em outros tubos, denominados “coelhos”, para inserção no reator nuclear do CDTN por meio pneumático.

3.4.6.2 Irradiação e Contagem

Para a determinação de íons cloreto na sílica cloropropilpiridínio, mediu-se a radiação gama produzida do decaimento do cloro ativado obtido na reação: $^{37}\text{Cl}(n,\gamma)^{38}\text{Cl}$, meia-vida de 37,29 min. A potência aplicada no reator foi de 100 kW e o fluxo de nêutrons térmicos de $6,6 \times 10^{11}$ nêutrons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para o grupo de amostras irradiadas, foram ativados padrões de sódio, em triplicata, para confirmação de k_0 e padrões aquosos de cloro, para construir a curva analítica. O

tempo de irradiação tanto para o sódio como para o cloro, foi de 5 min, tendo sido as amostras irradiadas uma a uma.

Após cada irradiação, foi esperado um tempo de dois minutos para que decaíssem os radionuclídeos de meias-vidas mais curtas, que pudessem interferir na espectrometria gama. Após esse tempo, as amostras foram inseridas no poço apropriado do detector. No sistema de detecção gama, composto de detector de germanio de alta pureza (HPGe), com eletrônica associada e programa de aquisição e avaliação de espectros Genie-PC da Canberra, foram levantados os espectros por um tempo necessário para que se alcançasse uma boa estatística de contagem. A área sob o pico gama de 1642 keV foi utilizada para os cálculos de concentração do cloro.

3.5 Caracterização Cromatográfica da Fase Estacionária

Os materiais sintetizados, em meio anidro e em presença de água, foram utilizados como fase estacionária para recheiar colunas cromatográficas empregadas na separação de alguns ânions orgânicos e inorgânicos.

3.5.1 Enchimento da Coluna Cromatográfica

A massa de fase estacionária necessária para o enchimento da coluna cromatográfica é proporcional ao volume da coluna, o qual é calculado através da equação do volume de um cilindro vazio. Conhecendo-se a densidade da sílica, o valor do volume calculado pode ser convertido para a massa de fase estacionária a ser pesada.

Para o enchimento das colunas cromatográficas de 150 x 3,9 mm prepararam-se suspensões com as fases estacionárias, que consistiram em pesar 2,2 g de SilprPi em tubos de ensaio e adicionar 22 mL de clorofórmio (suspensão 10 % m/v). Para a coluna de 60 x 3,9 mm pesa-se entre 0,72 a 0,74 g da sílica modificada e suspende-

se em 7-8 mL de clorofórmio. Um excesso de 20 % de material foi utilizado para garantir uma compactação completa dentro da coluna. Os tubos foram tampados, colocados em um roto-torque e as suspensões mantidas sob agitação constante, por um período superior a 12 h, antes de serem colocadas no reservatório do sistema, para o recheio das colunas cromatográficas (Figura 12).



Figura 12 - Roto-torque com a suspensão da sílica SilprPi em clorofórmio.

O procedimento de enchimento consiste em fazer passar a suspensão de sílica do reservatório de suspensão até a coluna, ocorrendo assim, a formação do leito cromatográfico. Para realizar essa etapa, utiliza-se um solvente propulsor (metanol) impulsionado por uma bomba pneumática Haskel, a uma pressão de 34 MPa (5000 psi)

Antes de iniciar o enchimento da coluna cromatográfica, verifica-se sempre possíveis vazamentos no sistema, que podem gerar variação na pressão, ocasionando no processo uma distribuição não homogênea da fase estacionária com conseqüente perda de eficiência. Após essa etapa, acopla-se a coluna ao reservatório da suspensão, com capacidade de 32 mL, transfere-se a suspensão para o reservatório, completando-o com clorofórmio. É colocada uma proveta na parte inferior da coluna para medir o volume de solvente que passa na mesma durante o seu enchimento. Após abrir a válvula da bomba Haskel, a pressão exercida pelo gás nitrogênio força a passagem do solvente de suspensão, em seguida o solvente propulsor (MeOH) pela fase estacionária, ficando esta retida graças a presença de um filtro no final da

coluna. O sistema é mantido sobre pressão constante até se coletarem 80 mL de solvente. Após o enchimento a coluna permanece conectada por um período de 20 min, em seguida o sistema é despressurizado e a coluna é desconectada da linha.

O excesso de FE que sobra no topo da coluna é removido por uma espátula e são colocadas as conexões da coluna (manga contendo anel com filtro, redutor e porca terminal). A Figura 13 mostra o sistema utilizado no enchimento das colunas.

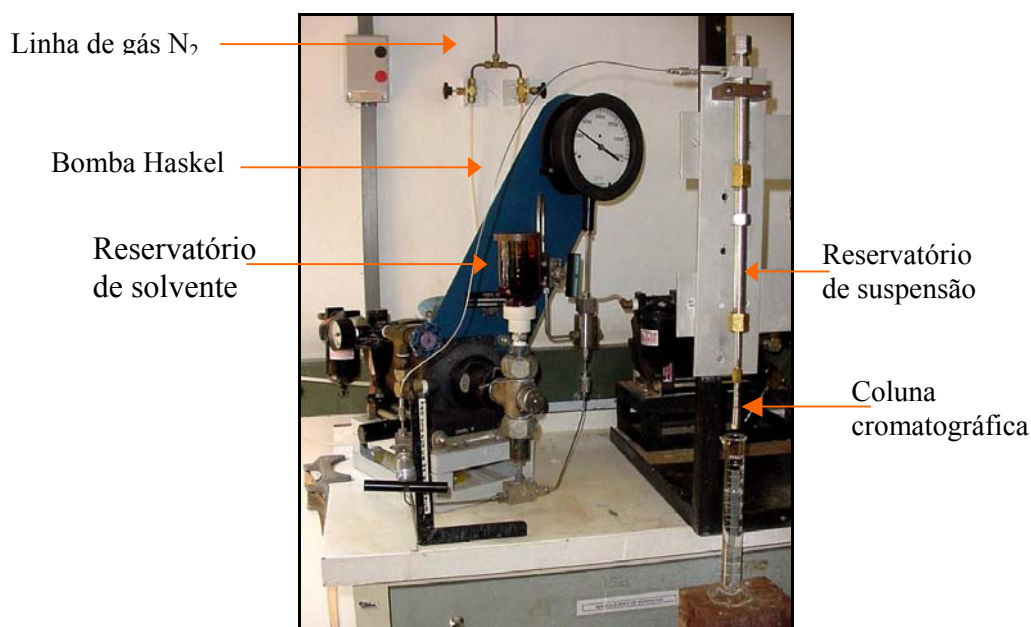


Figura 13 - Foto do sistema de enchimento de uma coluna cromatográfica.

3.5.2 Condicionamento da Coluna Cromatográfica Pós-enchimento

Após o enchimento da coluna cromatográfica, há a necessidade de se fazer um condicionamento da mesma, buscando-se uma eliminação completa dos resíduos do solvente usado no enchimento, além de estabelecer um equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel. Dessa forma, foram passados 20 volumes de coluna de isopropanol, na vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e, em seguida, considerando-se o caráter polar da fase estacionária, foram passados 20 volumes da fase móvel normal, hexano: diclorometano 95:5 (v/v) na vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Durante essa etapa, não é conveniente fazer o acoplamento da coluna ao detector para evitar que partículas provenientes da coluna possam obstruir a entrada e saída do detector ou mesmo contaminar a cela de detecção.

3.5.3 Avaliação Cromatográfica da Fase Estacionária

Neste trabalho foram usadas duas misturas teste para se conhecer o comportamento das fases estacionárias SilprPi, uma preparada em meio anidro e a outra em presença de água. A primeira mistura teste foi utilizada na separação em fase normal, para avaliar a fase quanto à formação do leito cromatográfico e a segunda, aplicada em uma separação por troca-iônica dos íons de interesse para verificar a seletividade e a eficiência cromatográfica.

3.5.3.1 Separação em Fase Normal

As avaliações cromatográficas foram realizadas com uma mistura de compostos orgânicos de diferentes polaridades, tais como: benzeno, álcool benzílico, antraceno, benzonitrila e nitronaftaleno em fase móvel normal. A mistura teste foi preparada a partir da dissolução dos analitos na própria fase móvel, hexano: diclorometano 95:5 (v/v). Tanto a solução da mistura teste como a fase móvel foram armazenadas em geladeira.

A escolha desta mistura teve por objetivo avaliar as colunas quanto ao seu desempenho frente a compostos polares. Essas separações foram realizadas utilizando um cromatógrafo a líquido Waters, composto de uma bomba e um detector espectrofotométrico de absorção no UV/VIS de comprimento de onda variável, sendo que a detecção foi realizada em 254 nm. O volume de injeção foi de 5 µL.

As soluções da fase móvel foram filtradas em membrana de nylon de 0,22 µm (Millipore) e degaseificadas por 10 min em banho ultrassônico. Os cálculos dos parâmetros cromatográficos dessas separações, a eficiência cromatográfica, avaliada

por meio do número de pratos por metro (N/m), calculada na meia altura do pico e a altura reduzida do prato (h), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de assimetria (As) medido a 10% da altura do pico, foram obtidos através do *software* Chrom Perfect da Justice Innovation.

A mistura teste foi separada em diferentes vazões compreendendo de 0,1 a 1,5 mL min⁻¹. Através da construção da curva de van Deemter [119], a qual indica a vazão ótima, onde a eficiência da coluna é máxima, foi determinada a vazão ótima de 0,4 mL min⁻¹.

3.5.3.2 Separação por Troca Iônica

Para a separação dos ânions nas colunas de sílica propilpiridínio, SilprPi, utilizou-se o método de eluição isocrático com detecção por condutividade sem supressão. Pelas inúmeras variáveis que devem ser consideradas em uma separação por Cromatografia por Troca Iônica (CTI) é difícil de se prever a ordem de eluição dos analitos em uma corrida cromatográfica.

3.5.3.2.1 Condicionamento da Coluna para Separação por Troca Iônica

Após a separação em fase normal, as colunas foram acondicionadas em metanol ou isopropanol puro. Para realizar a separação dos ânions, utilizando a CTI, a polaridade da fase móvel foi mudada lentamente. Primeiro, usou-se uma mistura de metanol:água 70:30 (v/v) e em seguida, metanol:água 50:50 (v/v). Pelo menos 20 volumes de coluna de cada uma dessas misturas foi passada através da coluna. Em seguida, a coluna foi condicionada com uma fase móvel tampão aquoso de ftalato em uma concentração 250 mmol L⁻¹ em pH 3,8, na vazão de 0,5 mL min⁻¹, por 2 h. Essa concentração representa 100 vezes a concentração da fase móvel de trabalho.

Para a realização dessa troca de fase móvel e para todos os testes cromatográficos foi usado um cromatógrafo Shimadzu, com detector de condutividade sem supressão e volume de injeção de 20 µL.

3.5.3.2.2 Otimização das Condições Analíticas para a Separação dos Ânions

Para a otimização das melhores condições de separação por troca iônica foi usada uma mistura composta de cloreto, nitrito, brometo e nitrato, todos em concentração de 10 mg L^{-1} , diluídos em água deionizada a partir de uma solução padrão. Foram realizadas corridas cromatográficas utilizando-se as colunas de $150 \times 3,9 \text{ mm}$ com concentrações variadas do tampão ácido ftálico / tris(hidroxi metil)aminometano (TRIS), variando-se a concentração do ácido de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e a do TRIS de $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ a $9,8 \text{ mmol L}^{-1}$. A concentração mais adequada foi de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ftálico e $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de TRIS. Também foram feitas separações em diferentes valores de pH, definindo-se o pH entre 4,1 e 4,2 como a faixa mais adequada para a separação de um maior número de ânions de interesse analítico em uma mesma corrida cromatográfica.

Para a preparação da solução tampão de ftalato nesta concentração, dissolveram-se 0,415 g de ácido ftálico em água deionizada. Essa dissolução foi feita a quente sob agitação constante, em um agitador magnético. Após a solubilização, adicionaram-se a essa solução, ainda sob agitação, 0,291 g do tampão TRIS, resultando na concentração de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$. A solução tampão foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, com H_2O deionizada. A fase móvel de trabalho foi preparada diariamente por diluição do tampão 100 vezes mais concentrado, guardado em geladeira por um período máximo de 14 dias [128]. Após a diluição com água deionizada e resfriamento, o pH foi medido em um potenciômetro calibrado com soluções tampão 4,00 e 7,00 obtendo-se valores de pH entre 4,1 e 4,2, não sendo necessário o ajuste do valor de pH da solução.

A temperatura do forno de coluna foi testada entre $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$, estabelecendo-se como $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a temperatura adequada para as separações dos ânions e mantendo-se no laboratório, durante todos os experimentos realizados, a temperatura constante de $22 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir desses dados foi determinada a vazão ótima de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ para a separação dos ânions. Porém, todas as separações por troca-

iônica foram realizadas com vazões variando entre 1,2 mL min⁻¹ a 1,5 mL min⁻¹, para reduzir o tempo total de análise.

A eficiência das fases estacionárias para a separação dos analitos de interesse foi avaliada por meio dos parâmetros: número de pratos/metro (calculados a meia altura do pico), altura reduzida de pratos (h), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de alargamento medido a 5% da altura do pico (TF_{5%}), usando o *software* do sistema Shimadzu.

Para a separação de uma mistura teste contendo os ânions inorgânicos: cloreto, nitrito, brometo e nitrato, utilizou-se uma fase móvel composta por uma solução de ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹, tamponada com TRIS 2,4 mmol L⁻¹, resultando em uma solução com valor de pH igual a 4,2.

As injeções foram realizadas quando a linha de base ficou estável. Os fatores de retenção foram calculados utilizando o *software* do sistema Shimadzu. O t_M do sistema, tempo morto do composto não retido, utilizado para calcular o fator de retenção, foi medido neste caso pelo pico de injeção.

3.5.3.3 Teste de pH

Uma das maneiras de avaliar cromatograficamente a fase estacionária SilprPi foi verificar a separação de alguns ânions em diferentes valores de pH. Para este experimento utilizou-se uma coluna cromatográfica de dimensões 60 x 3,9 mm de diâmetro interno. O condicionamento com a fase móvel de ftalato seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.5.3.2.1.

O tampão usado como fase móvel foi o ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹, variando-se a concentração de TRIS para obter o valor de pH desejado. A mistura de padrões injetada para esse teste foi composta pelos íons cloreto (5,0 mg L⁻¹), nitrito e nitrato (10 mg L⁻¹), e as condições operacionais do sistema cromatográfico foram as seguintes: vazão da fase móvel: 0,8 mL min⁻¹, temperatura do forno: 30 °C, detecção: por condutividade sem supressão e volume de injeção: 20 µL.

3.5.3.4 Teste de Estabilidade

O acompanhamento da mudança da eficiência em função do volume da fase móvel que passou na coluna foi realizada com a fase estacionária SilprPi-H₂O. Ao longo dos dias foi feita a injeção periódica de uma solução padrão, composta de uma mistura de íons cloreto e nitrato nas concentrações de 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ respectivamente. Para esse experimento utilizou-se uma coluna cromatográfica de dimensões 60 x 3,9 mm de diâmetro interno.

As injeções da mistura teste foram realizadas em duplicatas, tanto pela manhã quanto a tarde, e sempre seguidas da injeção de uma amostra de referência, contendo os mesmos ânions da mistura de padrões.

Para simular o uso longo e contínuo, o eluente foi repostado no reservatório com a bomba operando na vazão de 0,1 mL min⁻¹. Esse sistema operou continuamente por mais de 5 semanas a uma vazão de 0,1 mL min⁻¹, durante a noite, e 0,8 mL min⁻¹, durante o dia, vazão definida para obtenção dos parâmetros cromatográficos.

3.6 Aplicações da Nova Fase Estacionária

3.6.1 Separação de Alguns Ânions

A nova fase SilprPi-H₂O foi aplicada na separação de diversos ânions orgânicos e inorgânicos na concentração otimizada do tampão com ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ e TRIS 2,4 mmol L⁻¹ em pH 4,2. Vários ânions monovalentes inorgânicos foram testados tais como fluoreto, cloreto, brometo, nitrito, nitrato, cianato, tiocianato, clorato, bromato, hidrogeno-fosfato, iodato e a azida, incluindo-se também alguns orgânicos como o lactato, oxalato, acetato, citrato e formiato. Também foram injetados alguns ânions divalentes como o sulfato e tiosulfato.

3.6.2 Quantificação de Ânions

As soluções padrão de iodato, iodeto, azida, tiosulfato, tiocianato, clorato, hidrogeno-fosfato e bromato, injetadas para teste da coluna SilprPi-H₂O, foram preparadas a partir de seus sais, com uma concentração inicial de 100 mg L⁻¹ conforme procedimento descrito na literatura [129, 130]. A partir daí foram feitas as diluições necessárias à separação cromatográfica. Também, alguns ácidos orgânicos como os ácidos oxálico, succínico, cítrico e tartárico foram preparados na mesma concentração por dissolução do composto sólido em água deionizada. Estas soluções foram filtradas utilizando-se uma seringa de 3 mL acoplada a um filtro de membrana de 0,45 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.

3.6.2.1 Condições Operacionais da Análise

As separações dos diversos ânions, tanto inorgânicos quanto orgânicos, foram realizadas em um sistema de cromatografia da Shimadzu, com detector de condutividade sem supressão, empregando uma coluna de 150 x 3,9 mm de diâmetro interno, recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O e usando as seguintes condições otimizadas:

- Fase móvel: solução tampão de ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹, pH 4,1;
- Vazão da fase móvel: 1,2 mL min⁻¹;
- Tempo de análise: 25 minutos;
- Temperatura do forno da coluna: 30 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Condições de detecção: ganho: 0,1 µS cm⁻¹; atenuação: 4; polaridade: positiva.

3.6.2.2 Preparo de Padrões e Construção da Curva Analítica

Na construção da curva analítica e avaliação estatística de alguns parâmetros de validação, tais como limite de detecção, quantificação, precisão e exatidão, optou-se pela separação simultânea de quatro ânions monovalentes: cloreto, nitrito, brometo e nitrato. As soluções padrão dos ânions individuais (Merck – CertiPur) foram diluídas para fornecer soluções de cada um dos ânions com concentrações variando entre 0,25 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹.

A partir da área do pico de cada ânion, nas diferentes concentrações injetadas, foram construídas as curvas analíticas aplicando-se o método dos mínimos quadrados, obtendo-se por interpolação na curva analítica uma estimativa da concentração real dos analitos injetados. Foram inseridos, nesses procedimentos, duas amostras de referência, a CRM408 com concentração de íons cloreto e íons nitrato de 2,4 mg L⁻¹ e 1,2 mg L⁻¹ respectivamente e a CRM409, com valores de íons cloreto de 4,0 mg L⁻¹ e íons nitrato de 4,8 mg L⁻¹. Procedente da Comunidade Européia, essas amostras padrão certificadas correspondem a água de chuva simulada contendo um alto nível de eletrólitos, armazenadas e seladas em ampola de quartzo. Esses materiais de referência foram esterilizados por irradiação gama (fonte de ⁶⁰Co, 25kGy). Não houve necessidade de um preparo dessas amostras antes de sua injeção.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Preparação da Sílica Propilpiridínio (SilprPi e SilprPi-H₂O)

Nos processos de modificação química utilizou-se uma sílica da marca Davisil, forma irregular, tamanho de partícula de 10 μm , tamanho de poros de 15 nm, volume de poro de $60,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e área de superfície de $263 \pm 8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, conforme resultado obtido pela análise BET. Este tamanho de partícula é freqüente em suporte cromatográfico de polimetacrilato e PS – DVB aplicado em cromatografia por troca iônica.

A modificação da superfície da sílica consistiu na utilização de um método descrito por Tundo et al. [77] no qual a sílica reage com um trialcoxissilano, sob refluxo, em presença de um solvente de baixa polaridade, tolueno. A representação dessa modificação química encontra-se esquematizada na Figura 14. Os silanóis da superfície da sílica sofrem reação com os grupos metoxi do agente sililante 3-cloropropiltrimetoxissilano para formar novas ligações Si-O-Si entre o suporte da sílica e os grupos orgânicos do silano.

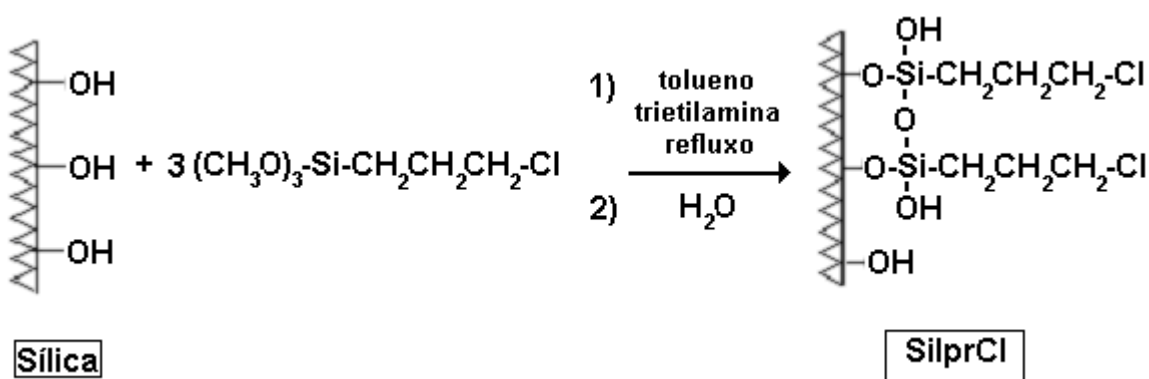


Figura 14 - Esquema da reação da modificação na superfície da sílica para produzir a SilprCl, após a hidrólise.

Para a segunda síntese, que foi realizada na presença de uma pequena quantidade de água, utilizou-se aproximadamente 700 μL de água deionizada, valor

estimado com base nos cálculos da concentração teórica dos grupos hidroxilas, nas 20 g de sílica usada. A adição da água foi feita com a finalidade de promover a polimerização do trialcoxissilano, aumentando assim a cobertura da superfície da sílica com grupos cloropropil. Acredita-se que essa polimerização seja aleatória, uma vez que a adição da água foi feita durante a reação, impossibilitando assim a formação de camadas monoméricas.

No final dessa etapa, as sílicas modificadas com cloropropil foram extensivamente lavadas com H₂O deionizada para promover a hidrólise total dos grupos metoxi remanescentes. Considerando-se que esse agente sililante é trifuncional, alguns grupamentos metoxi podem permanecer livres sobre a superfície da sílica, sendo suscetíveis às novas reações ou formação de novos grupamentos silanóis, conforme já discutido em trabalhos anteriores [70].

Na segunda etapa, foi utilizada a piridina em excesso (Figura 15) para reagir com os grupos cloropropil e produzir grupos de cloreto de propilpiridínio sobre a superfície da sílica. Esses grupos com cargas positivas são responsáveis pelas propriedades de troca aniônica deste material.

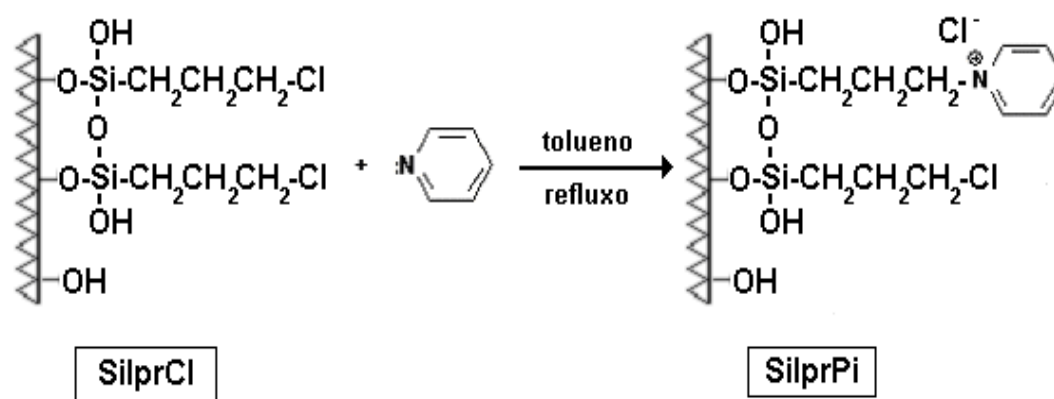


Figura 15 - Esquema da reação da sílica cloropropil com piridina para produzir as sílicas SilprPi e SilprPi-H₂O.

4.2 Caracterização Físico-Química

4.2.1 Análise Elementar

As análises elementares das sílicas silanizadas, SilprCl (sílica cloropropil) e SilprCl-H₂O, e das sílicas funcionalizadas, SilprPi e SilprPi-H₂O, foram realizadas para determinar as porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio existentes nos materiais obtidos nos dois meios reacionais.

As porcentagens de carbono (Tabela 2) mostram que na reação de silanização em presença de água, a quantidade de grupos cloropropil ligados à superfície da sílica, produzindo a SilprCl-H₂O, foi quase o dobro em relação à SilprCl preparada em meio anidro. Obteve-se 0,95 mmol g⁻¹ de grupos cloropropil por grama de SilprCl, em condições anidras, e 1,80 mmoles g⁻¹ de grupos cloropropil, para a SilprCl modificada em presença de água.

Na segunda etapa das sínteses, observa-se que, pela diferença da razão entre o percentual de carbono das SilprPi e SilprCl, que a quantidade de grupos piridínicos ligados à superfície da sílica silanizada foi ligeiramente maior na segunda. Pelos resultados, constata-se uma diferença entre os valores da porcentagem de hidrogênio e nitrogênio nos materiais obtidos através dos dois diferentes meios reacionais (Tabela 2).

As porcentagens de carbono obtidas nas análises elementares também são úteis para o cálculo do grau de recobrimento pelos grupos orgânicos na superfície da sílica, depois da reação com o agente sililante cloropropiltrimetoxissilano e após a reação com a piridina. O cálculo é realizado pela expressão recomendada pela literatura [131].

$$\chi = \frac{P_c}{1200n_c - P_c(M - n_x)} \frac{1}{S_{\text{BET}}}$$

sendo P_C a porcentagem de carbono na sílica modificada, n_C o número de átomos de carbono da molécula orgânica imobilizada, M a massa molecular do silano imobilizado, n_x o número de grupos reativos do alcoxissilano de partida, que pode ser 1 para os silanos monofuncionais e 3 para os trifuncionais e S_{BET} a área superficial da sílica Davisil, calculada a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio ($S_{BET} = 263 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).

O valor do grau de recobrimento de grupos orgânicos ligados sobre a superfície da sílica para a SilprCl, calculado pela expressão acima, é mostrado na Tabela 2. Neste caso, assumimos que existe uma única estrutura orgânica sobre a sílica e que pelo menos um grupo metóxi não reagiu para produzir a sílica modificada. Essas considerações não são válidas para as SilprPi, uma vez que nem todos os grupos cloropropil reagiram com a piridina. O grau de recobrimento das sílicas SilprPi foi estimado com base nos resultados da análise elementar (CHN), através do cálculo estequiométrico do percentual de nitrogênio por grama de SilprPi, dividindo-se pela área superficial da sílica Davisil, determinado pelo método BET. Os resultados mostram que, quando a primeira reação acontece em presença de água, ocorre a formação de uma camada orgânica mais completa nesse material.

Tabela 2 – Porcentagens de C, H e N e valores do grau de recobrimento (χ) dos grupos orgânicos na superfície das sílicas silanizadas e das sílicas funcionalizadas, em diferentes meios reacionais

	Anidra		Presença de água	
	SilprCl	SilprPi	SilprCl-H ₂ O	SilprPi-H ₂ O
Carbono (%)	3,5	5,3	6,5	8,4
Hidrogênio (%)	0,7	0,9	0,9	1,5
Nitrogênio (%)	0,1	0,9	0,6	1,1
χ ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	4,1	2,4	8,4	2,9

Pelo cálculo do χ utilizando os valores do percentual de nitrogênio resultante da análise elementar verificou-se também que o número de grupamentos piridínicos que reagiram com os grupos cloropropil foi ligeiramente menor na sílica silanizada em meio anidro. Possivelmente, na sílica modificada em presença de água, a polimerização aleatória do silano não permitiu que todos os grupos cloropropil estivessem disponíveis para a reação com a piridina.

4.2.2 Análise Termogravimétrica

A termogravimetria é uma técnica na qual a mudança de massa de uma substância é registrada como função da temperatura ou do tempo. O gráfico de massa ou porcentagem de massa em função da temperatura ou do tempo é chamada de termograma ou curva de decomposição térmica.

Para a sílica Davisil, a perda de massa é atribuída exclusivamente à perda de moléculas de água adsorvidas por ligações de hidrogênio, significando uma perda da ordem de 2% até 200 °C. Este efeito é perfeitamente visível nas curvas da Figura 16 para as duas fases da síntese em presença de água cujo comportamento até a temperatura de 200 °C é semelhante.

No intervalo entre 25 °C e 100 °C, temos a perda de água adsorvida na superfície das sílicas, que deve ser descontada para o cálculo da concentração de grupos orgânicos. A perda de massa observada entre 200 °C e 600 °C está associada à perda de grupos orgânicos ligados sobre a superfície da sílica [132].

Para as sílicas modificadas com o cloropropil, no intervalo de 200 °C a 900 °C tem-se a perda dos grupos orgânicos e também a condensação dos grupos silanóis remanescentes após a modificação com o cloropropil.

Para as sílicas propilpiridínio, percebe-se claramente (em ambos os casos) uma perda de massa bem definida no intervalo de 150 °C a 250 °C atribuída à perda de piridina, uma vez que esta perda não é observada nas curvas para as sílicas modificadas com o cloropropil. Após a reação com a piridina, conforme pode ser

visto nas Figuras 16A e 16B, o número de grupamentos orgânicos é maior e, em consequência, constata-se uma perda de massa mais elevada.

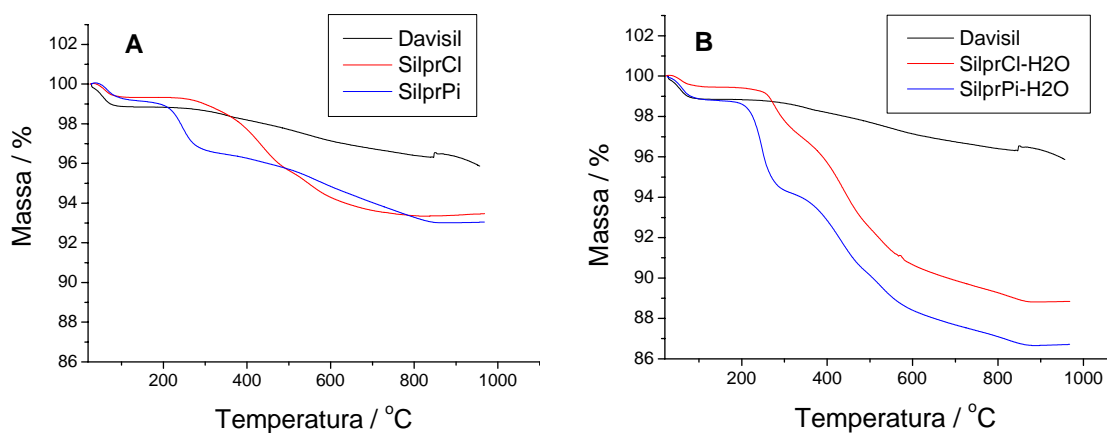


Figura 16 - Curvas termogravimétricas obtidas para a síntese em (A) meio anidro, (B) presença de água.

4.2.3 Espectroscopia no Infravermelho

Na Figura 17 são apresentados os espectros no infravermelho para a sílica pura e as sílicas silanizadas, SilprCl, obtidas nas sínteses em meio anidro e em presença de água. Na Figura 18 são apresentados os espectros das sílicas SiplrPi, obtidas após a reação com a piridina.

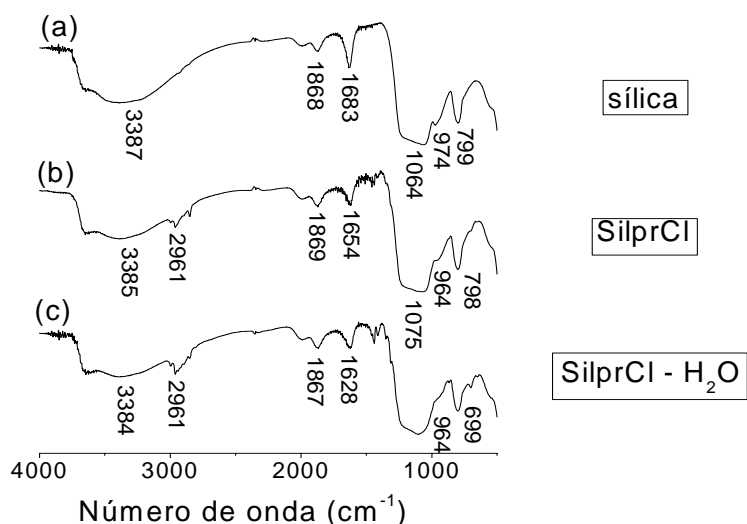


Figura 17 - Espectros no Infravermelho da (a) sílica Davisil, e da sílica silanizada: b) em meio anidro e (c) em presença de água.

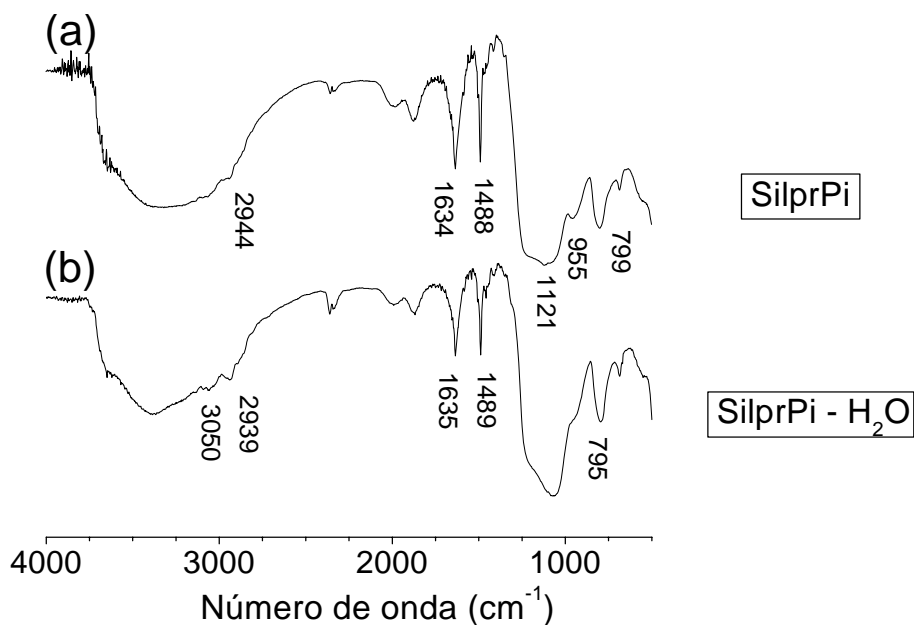


Figura 18 - Espectros no Infravermelho da sílica funcionalizada com piridina(a) em meio anidro e (b) em presença de água.

Observa-se uma banda na região de 1020 a 1100 cm^{-1} em todos os espectros atribuídos aos grupos siloxanos ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$), além de um ombro por volta de 970 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H do grupo silanol [133]. Um aspecto importante da Figura 18 é que, após a silanização, ocorre uma diminuição na intensidade desse ombro, comparado ao espectro da sílica pura. Nos espectros 17 (b)

e 17 (c), referentes à sílica silanizada com 3-cloropropiltrimetoxissilano, observam-se duas novas bandas em torno de 2960 cm^{-1} devidas ao estiramento C-H dos grupos cloropropil. Nesses espectros não se evidenciam diferenças estruturais para a sílica modificada em meio anidro e em presença de água.

Os espectros (a) e (b) da Figura 18, para a sílica propilpiridínio, SilprPi, também mostram bandas em 2939 e 3058 cm^{-1} associadas, respectivamente, ao estiramento C-H alifático e aromático. Duas bandas fortes surgem na região de 1630 e 1490 cm^{-1} , devido à presença do anel piridínio. De acordo com Silverstein et al. [134] e Pavia et al. [135] os picos estão relacionados ao estiramento C=C aromático e ao modo de vibração C-N, respectivamente.

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si e ^{13}C

As espécies detectadas na superfície da sílica são descritas na Figura 19 como Q^n , onde n representa o número de grupos siloxanos ligados ao átomo de silício.

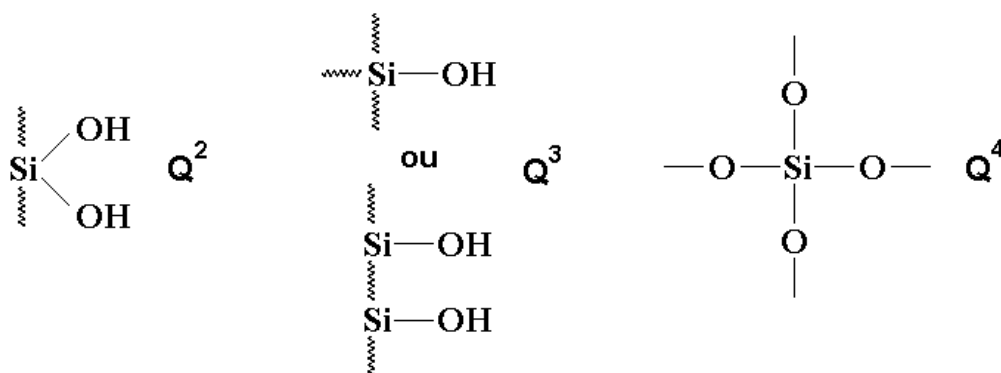


Figura 19 - Grupos silanóis e siloxanos presentes na estrutura da sílica.

Já as espécies T^n são originadas a partir da reação do silano, o cloropropiltrimetoxissilano, com os silanóis da sílica. Como o agente sililante é trifuncional, três diferentes espécies de silício T podem estar presentes na superfície da sílica, como mostra a Figura 20. Por outro lado, a espécie T^3 pode envolver a reação com um silanol do agente sililante, também mostrado na Figura 20.

Do ponto de vista cromatográfico, seria interessante obter apenas as espécies T^3 , as quais não possuem nenhum grupo hidróxi ligado ao átomo de silício e apresentam um maior número de ligações siloxanos. A probabilidade de uma mesma molécula do agente sililante reagir simultaneamente com três grupos silanóis na superfície da sílica é muito pequena, devido ao impedimento estérico ao redor do átomo de silício do agente sililante. Sendo assim, as ligações mais prováveis seriam 1:1 e 1:2. Por outro lado, a espécie T^3 pode envolver reação com um silanol do agente sililante, de acordo com a Figura 20.

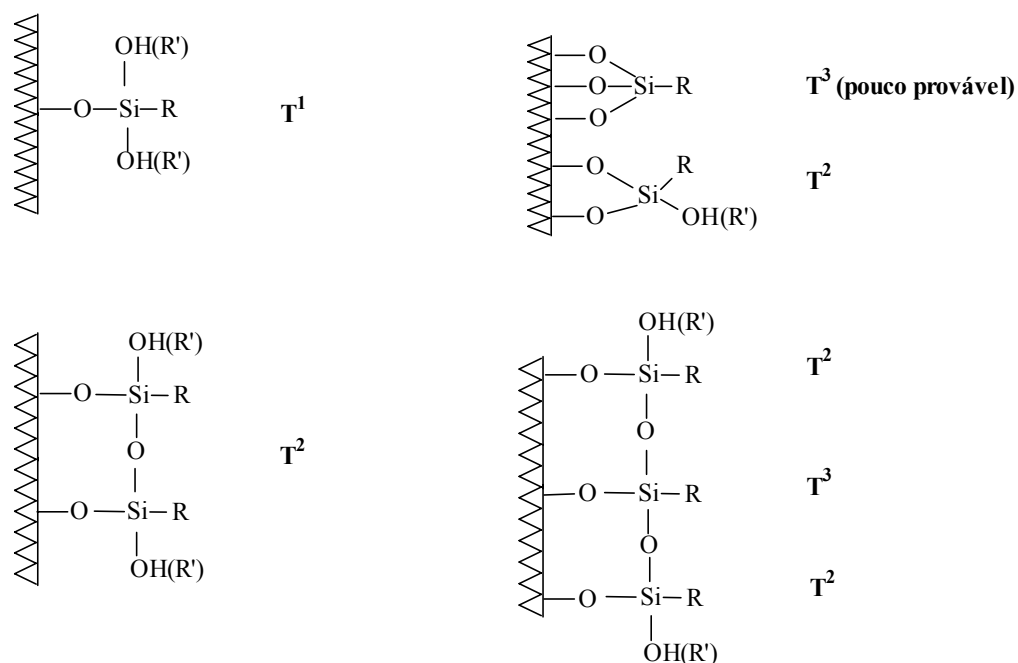


Figura 20 - Espécies de silício T que podem estar presentes na superfície da sílica silanizada com 3-cloropropiltrimetoxissilano.

No espectro da sílica original (Davisil), os silanóis geminais (Q^2), os silanóis livres (Q^3) e os siloxanos (Q^4) são detectados em -92, -101 e -110 ppm, respectivamente (Figura 21A). Esses grupos pertencem à estrutura inorgânica da sílica.

A Figura 21 também mostra os espectros de RMN de ^{29}Si obtidos após a modificação com trialcóxissilanos em meio anidro e na presença de água. Nos

espectros citados, os picos em -49, -57 e -67 ppm referem-se às espécies T^1 , T^2 e T^3 , respectivamente. Esses grupos são derivados da reação da molécula do agente sililante com os silanóis da sílica e a presença dos mesmos no espectro de ^{29}Si é uma clara indicação da ligação dos grupos orgânicos na superfície [136].

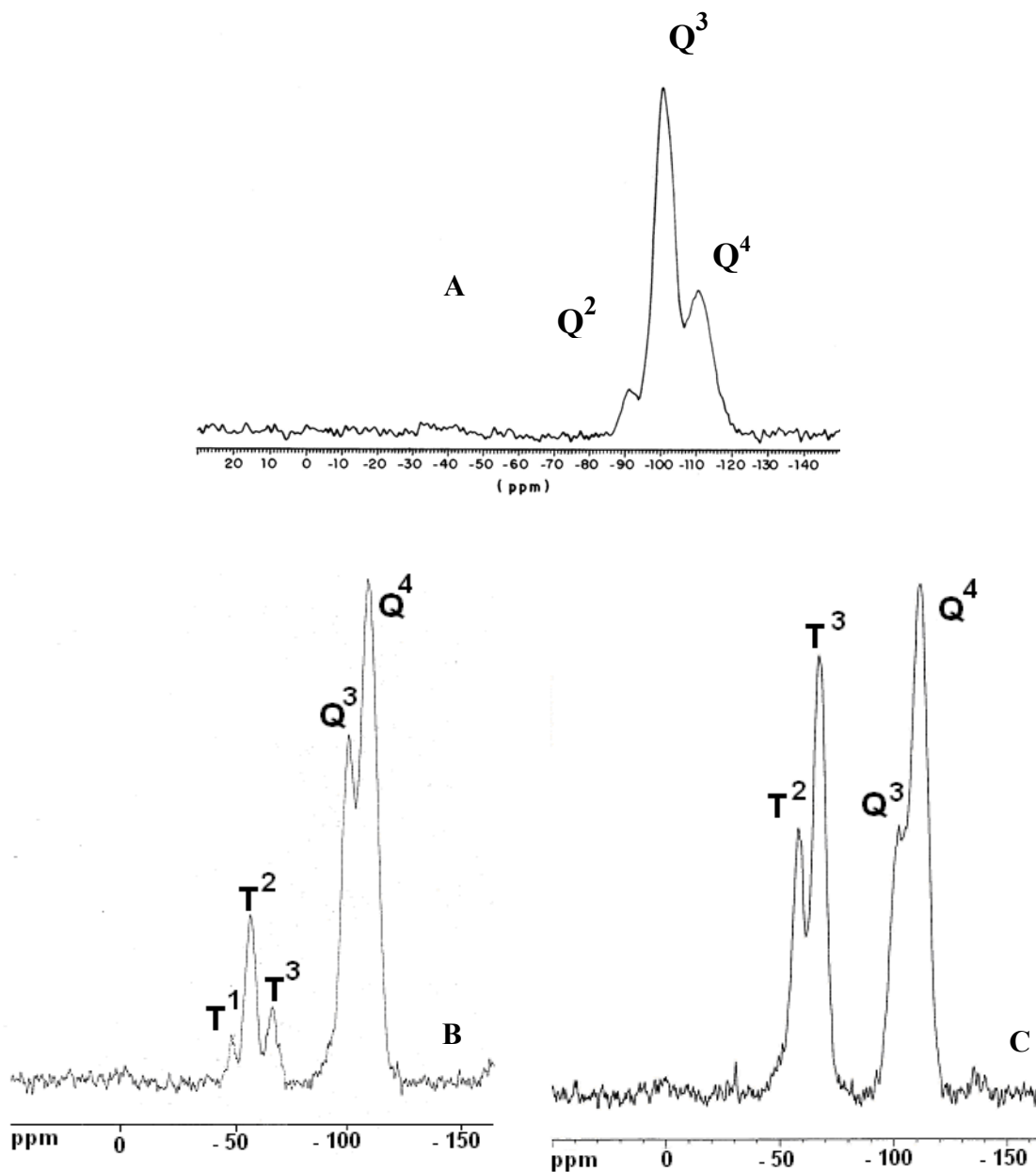


Figura 21 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si da sílica pura (A), da SilprCl em meio anidro (B) e na presença de água (C).

Observa-se que a espécie T^1 aparece apenas na reação realizada em meio anidro (Figura 21B). A ausência das espécies T^1 e picos de intensidades mais elevadas para T^2 e T^3 , mostrados na Figura 21C, sugerem um alto grau de entrecruzamento da camada cloropropil e a superfície da sílica. As espécies T^2 , apresentando grupos do tipo metóxi como vizinhos ao átomo central de silício, não podem ser diferenciadas daquelas que apresentam os grupos OH ligados ao silício. Ambas espécies apresentam o mesmo deslocamento químico no espectro de RMN de ^{29}Si .

Apesar da técnica de CP/MAS não ser quantitativa, verifica-se a ausência das espécies Q^2 em ambos os espectros e a população dos grupos Q^3 na sílica preparada na presença de água é bem menor quando comparada com o material obtido em meio anidro.

Na Figura 22A, representando o espectro de RMN de ^{13}C para a sílica silanizada, observa-se um sinal em 57 ppm referente aos grupos metóxi ($\text{CH}_3\text{O}-$) remanescentes da reação em meio anidro, sugerindo que o grau de recobrimento sobre a superfície da sílica foi diferente nas duas sínteses realizadas. Na Figura 22B, os três sinais observados em 10, 26 e 46 ppm estão relacionados ao grupo cloropropil ligado à sílica. A ausência de um sinal em 50 ppm sugere que os grupamentos metoxi ($\text{CH}_3\text{O}-$) foram totalmente hidrolizados durante o procedimento de lavagem após a reação de silanização, contribuindo assim para um melhor grau de recobrimento da superfície [137]. Os demais sinais referem-se aos átomos de carbono dos grupos cloropropil ligados na superfície da sílica.

Após a reação com a piridina foi obtido um novo espectro de RMN de ^{13}C . A Figura 23 mostra que novos sinais em 61, 128 e 142 ppm aparecem no espectro RMN de ^{13}C . O sinal em 61 ppm está relacionado ao carbono ligado ao átomo de nitrogênio da piridina e os sinais em 128 e 142 ppm referem-se aos carbonos do anel aromático.

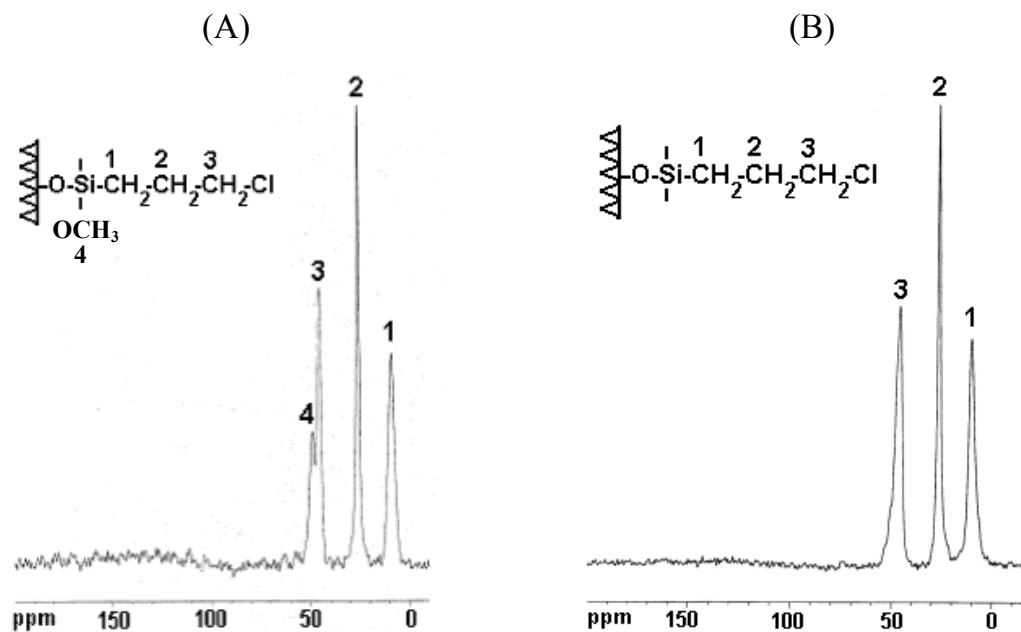


Figura 22 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da sílica silanizada, SilprCl, (A) em meio anidro e (B) em presença de água.

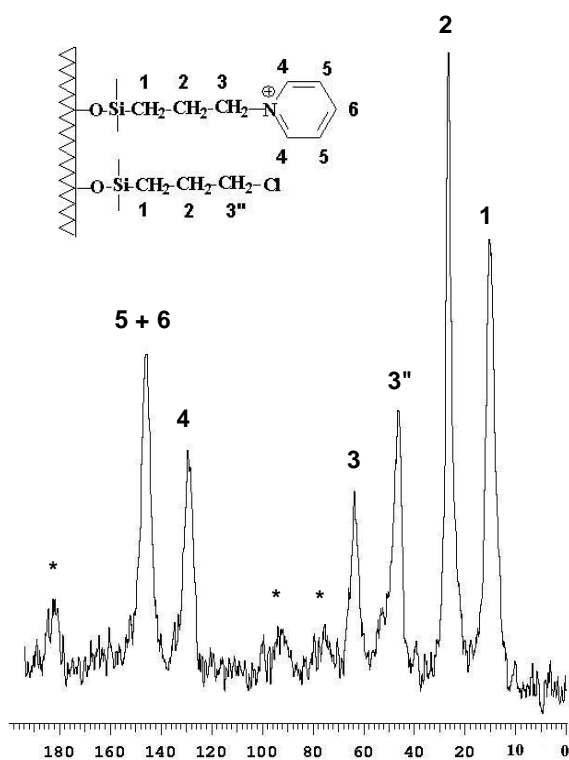


Figura 23 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da sílica propilpiridínio após a reação com a piridina. Os picos marcados com asteriscos representam bandas laterais.

4.3 Determinação da Capacidade de Troca da Sílica Funcionalizada

A capacidade de troca das sílicas funcionalizadas, SilprPi, em meio anidro e em presença de traços de água, foi verificada através da determinação da concentração de íons cloreto na solução sobrenadante determinada pela técnica de ativação neutrônica. Pelos dados da Tabela 3 constata-se que a capacidade de troca do íon cloreto ligado ao grupo propilpiridínio foi maior para a fase estacionária SilprPi preparada em presença de água, quando comparada com a capacidade de troca da SilprPi em condições anidro, indicando que o produto desta primeira reação disponibiliza um maior número de sítios de troca.

Tabela 3 - Capacidade de troca para a sílica funcionalizada, SilprPi, sintetizada em meio anidro e em presença de água, na determinação da concentração de contra-íon cloreto

Condições:	Capacidade de troca iônica / mmol g ⁻¹	
	HNO ₃ (0,1 mol L ⁻¹)	KNO ₃ (0,1 mol L ⁻¹), pH = 4,2
SilprPi	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,01
SilprPi-H ₂ O	0,44 ± 0,01	0,55 ± 0,01

O uso de uma solução ácida como meio trocador, HNO₃, foi recomendado por Gushikem e colaboradores [78, 79]. Entretanto, os resultados mostram que houve diferença quando a solução ácida foi substituída pela solução aquosa KNO₃ em pH 4,2 mas, essa diferença não foi significativa em alterações, no processo cromatográficos. Por outro lado, o uso desta solução aquosa teve como objetivo simular as mesmas condições de pH empregadas durante a separação cromatográfica de alguns ânions.

4.4 Caracterização Cromatográfica

Após o enchimento e condicionamento das colunas cromatográficas, inicia-se uma nova etapa com a finalidade de verificar a seletividade da fase estacionária sintetizada e o nível de compactação do leito cromatográfico, ou seja, avaliar a presença ou ausência de espaços vazios dentro da coluna. Nessa fase, é verificado o desempenho da coluna pela avaliação dos parâmetros cromatográficos, calculados através de um software, após a injeção e detecção de soluções padrão de concentrações conhecidas.

4.4.1 Separação em Fase Normal

As avaliações cromatográficas foram inicialmente realizadas usando uma mistura teste de compostos orgânicos polares e não polares, em fase móvel normal. A injeção desta mistura de padrões teve como objetivo avaliar se o enchimento foi adequado ou não. Esta avaliação é feita através da medida de alguns parâmetros cromatográficos que darão indicação do grau de seletividade e eficiência da separação da fase estacionária. Um ponto favorável da utilização da fase móvel normal é que os solventes de baixa polaridade, ao passarem continuamente na coluna, eliminam os resíduos de solventes utilizados durante o processo de enchimento.

Foram recheadas quatro colunas cromatográficas (150 x 3,9 mm d.i.), uma com a fase estacionária SilprPi e três com a fase SilprPi-H₂O. Para cada coluna recheada foram determinados os parâmetros cromatográficos e a vazão ótima através da injeção de amostras da mistura teste em diferentes vazões de fase móvel, que variaram de 0,1 mL min⁻¹ a pelo menos 1,2 mL min⁻¹. As curvas de altura de pratos (H) x vazão foram obtidas e são mostradas na Figura 24. Nesta, se observa comportamentos semelhantes para as colunas recheadas, frente as mesmas condições

de análise. Todas elas apresentam vazão ótima próxima, ou seja, a vazão na qual a coluna apresenta uma eficiência máxima, situada entre 0,3 e 0,4 mL min⁻¹.

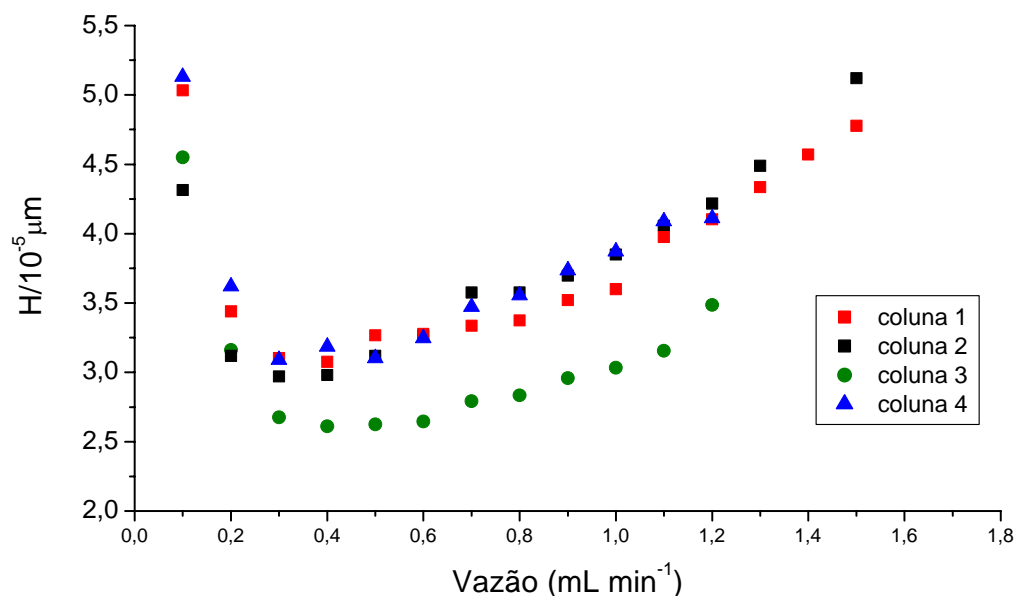


Figura 24 - Curvas da altura de pratos (H) para o nitronaftaleno, em diferentes vazões de FM para as colunas de 150 x 3,9 mm recheadas com as fases SilprPi (coluna 1) e SilprPi-H₂O (colunas 2, 3 e 4). Condições: FM: hexano:diclorometano 95:5 (v/v). Detecção UV a 254 nm e volume de injeção 5 μL.

Os cromatogramas obtidos após a injeção da mistura teste nas colunas recheadas com as fases estacionárias SilprPi e SilprPi-H₂O na vazão ótima de 0,4 mL min⁻¹, usando a fase móvel hexano:diclorometano 95:5 (v/v), são mostrados nas Figuras 25 e 26 e os seus parâmetros cromatográficos são apresentados nas Tabelas 4 e 5 respectivamente.

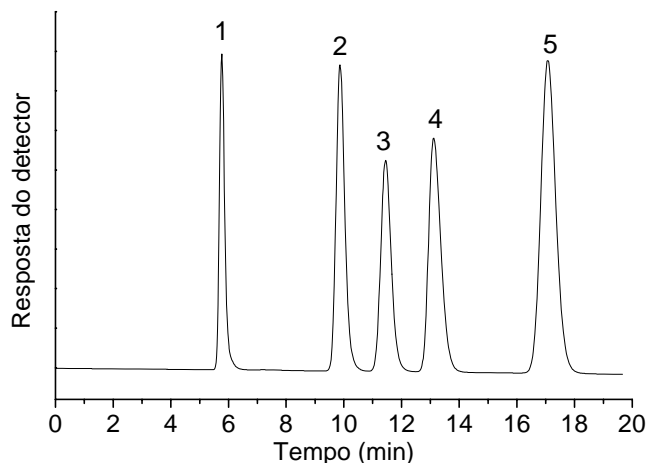


Figura 25 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi. Condições cromatográficas: FM: hexano:diclorometano 95:5(v/v); vazão: 0,40 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 µL. Detecção: UV a 254 nm; mistura teste: 1 – benzeno; 2 – antraceno; 3 – álcool benzílico; 4 – benzonitrila; 5 – nitronaftaleno.

Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos na coluna recheada com a FE SilprPi (coluna 1) usando condições de fase normal

Compostos	SilprPi - Parâmetros cromatográficos			
	N/m	TF ^a	k ^b	Rs
Benzeno	30 800	1,1	-	-
Antraceno	33 900	1,1	1,1	12,7
Álcool benzílico	32 900	1,2	1,4	2,5
Benzonitrila	26 800	1,6	1,7	1,3
Nitronaftaleno	32 500	1,1	2,7	5,7

^aFator de alargamento do pico a 5% de sua altura.

^bt_M medido com o benzeno.

O benzeno foi definido como o composto não retido embora sabendo-se que este possa algumas vezes interagir com o grupamento propilpiridínio. Uma altura reduzida de pratos de 3,0 para o composto mais retido, nitronaftaleno, e um baixo valor de assimetria para todos os compostos, evidenciam que as colunas foram bem recheadas (Tabela 4).

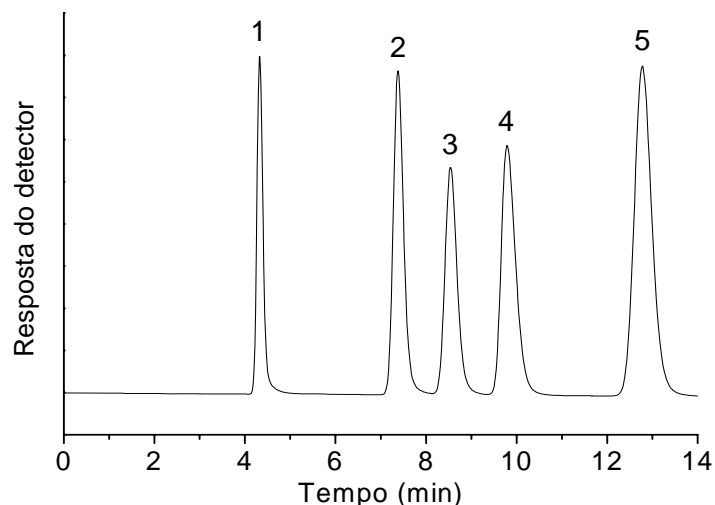


Figura 26 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: hexano:diclorometano 95:5 (v/v); vazão: 0,40 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 µL. Detecção: UV a 254 nm. Mistura teste: 1 – benzeno; 2 – antraceno; 3 – álcool benzílico; 4 – benzonitrila; 5 – nitronaftaleno.:

Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os compostos na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O (coluna 2) usando condições de fase normal

Compostos	SilprPi-H ₂ O - Parâmetros cromatográficos			
	N/m	TF ^a	k ^b	Rs
Benzeno	33 500	1,5	-	-
Antraceno	33 800	1,3	0,7	9,3
Álcool benzílico	32 300	1,4	1,0	2,6
Benzonitrila	29 800	1,7	1,3	2,3
Nitronaftaleno	33 500	1,3	2,0	4,6

^aFator de alargamento do pico a 5% de sua altura.

^bt_M medido com o benzeno.

Esse comportamento também é evidente pelos valores apresentados na Tabela 6 que representam os parâmetros obtidos na vazão ótima para o nitronaftaleno, composto mais retido. De uma maneira geral, os valores de eficiência, e fator de alargamento do pico, não são divergentes.

Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos obtidos para o nitronaftaleno na vazão ótima nas colunas SilprPi e SilprPi-H₂O

Colunas	Parâmetros cromatográficos			
	N/m	TF ^a	k ^b	Rs
1 (SilprPi)	32 500	1,1	2,7	5,7
2 (SilprPi-H ₂ O)	33 500	1,3	2,0	4,6
3 (Silprpi-H ₂ O)	38 300	1,1	1,1	2,8
4 (SilprPi-H ₂ O)	31 400	1,2	1,7	2,3

^aFator de alargamento do pico a 5% de sua altura

^b t_M com o benzeno.

4.4.2 Separação por Troca Iônica

Para realizar a separação de ânions na coluna recheada com a sílica SilprPi utilizando a cromatografia por troca iônica, a polaridade da fase móvel, em uma primeira etapa, foi mudada lentamente de uma condição de fase normal para um ambiente de troca iônica. Um dos problemas de trocar da fase não aquosa (FN) para uma de água tamponada está relacionado com a solubilidade da água em hexano de 0,2 % [138]. Para realizar a troca da FM, foram passados pelo menos 20 volumes de coluna de isopropanol ou metanol puro e, a seguir, metanol:água nas proporções de 70:30 (v/v), 50:50 (v/v) e por fim 30:70 (v/v). A mudança lenta de polaridade de uma fase móvel praticamente apolar para uma fase móvel polar foi para evitar o impacto da diferença de polaridade que, quando realizado de maneira brusca, pode causar rachamento do leito da coluna cromatográfica e entumescimento das partículas de sílica. Deve ser lembrado que as partículas de resinas sofrem também alterações significativas nos seus formatos com mudanças no solvente.

Neste trabalho, para todas as separações cromatográficas de ânions orgânicos e inorgânicos, realizadas com as FE SilprPi e SilprPi-H₂O obtidas nos diferentes meios de reação, foi utilizada a técnica de CTI sem supressão método isocrático, com detecção por condutividade.

A primeira coluna a ser avaliada continha a FE preparada no meio anidro. Embora, a sílica funcionalizada em meio anidro (SilprPi) não tenha apresentado

resultados tão bons quanto a sílica funcionalizada na presença de água (SilprPi-H₂O) em relação à caracterização física e química, foram feitos alguns experimentos de separação por troca iônica. Essa escolha foi fundamentada em uma avaliação da separação em fase normal, cujos valores de eficiência obtidos para as duas fases não foram muito diferentes.

Como um teste preliminar escolheu-se uma metodologia conhecida e bastante usual na separação de ânions com colunas comerciais contendo fases estacionárias funcionalizadas com grupos amina. Para a síntese realizada em meio anidro os resultados obtidos não foram adequados como mostram os cromatogramas da Figura 27 podendo estar relacionados com um menor número de sítios trocáveis nessa FE.

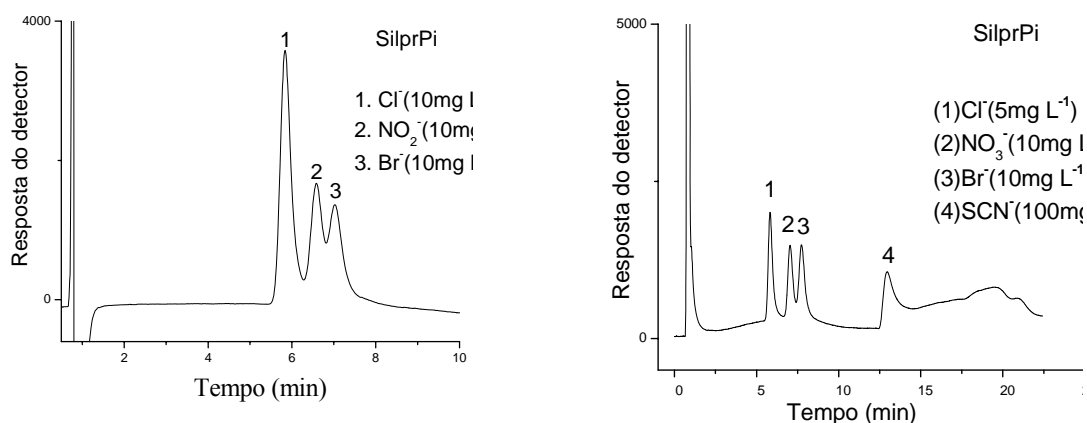


Figura 27 – Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária SilprPi. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.

Utilizando-se as mesmas condições para a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O os resultados obtidos nessa separação foram bastante promissores. Nessa fase, os ânions da mistura teste foram separados com boa seletividade, como mostra a Figura 28. A partir desse experimento ficou estabelecido otimizar-se as separações dos ânions utilizando-se a coluna recheada com a fase SilprPi-H₂O.

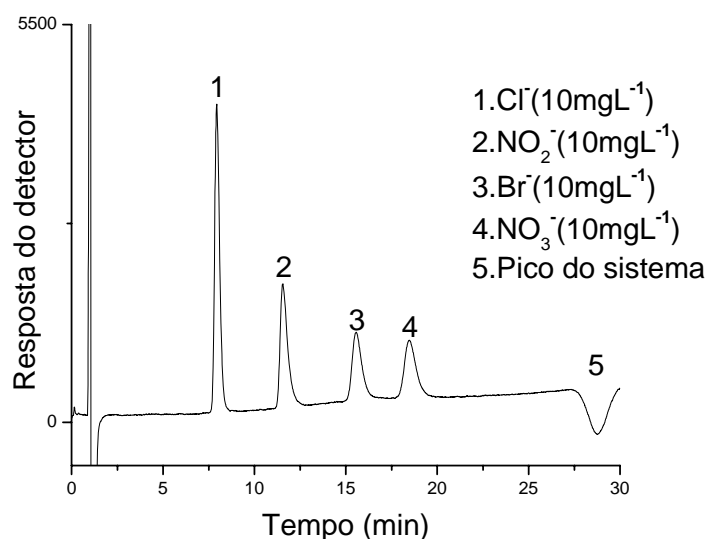


Figura 28 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 5,0 mmol L⁻¹ / TRIS 4,8 mmol L⁻¹; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.

4.4.2.1 A Escolha da Melhor Fase Móvel (FM)

A fase móvel empregada em cromatografia por troca iônica é uma solução com propriedades tamponantes, escolhida de forma a ser compatível com o trocador iônico selecionado. Conforme descrito na literatura [1, 15, 30, 33, 39], existem muitos sais de ácidos orgânicos fracos adequados para utilização como modificadores da FM em separações por troca iônica e que estão disponíveis comercialmente. Neste trabalho, com relação a fase móvel, foram consideradas passíveis de utilização, as soluções tampão com valores de pH situados entre 3,0 e 7,0.

Inicialmente, utilizou-se como FM um ácido carboxílico alifático, o ácido cítrico, adequado à separação por troca iônica, que se diferencia de outros ácidos polipróticos, tais como succínico, málico, fumárico, acético e fórmico, por ser um íon competidor mais forte, especialmente quando usado na forma completamente ionizada [34]. A separação cromatográfica consistiu de uma solução de citrato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ e detecção no UV, para a separação simultânea de F⁻, Br⁻, I⁻,

NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} em uma solução, contendo 10 mg L^{-1} de cada um desses íons. Essa metodologia foi utilizada por Matsushita et al. [139] para a separação de diversos ânions orgânicos e inorgânicos, utilizando uma fase estacionária com suporte de sílica funcionalizada com grupos aminoetil quaternário e detecção no UV. Os testes foram desmotivadores, pois a maior parte dos ânions eluiu simultaneamente com a fase móvel, em um tempo de retenção de 3,3 minutos. Nem todos os ânions absorvem o suficiente para usar a detecção UV direta.

Fritz e Li [140] realizaram experimentos para a separação de ânions utilizando hidrogeno ftalato de potássio e benzoato de sódio como fase móvel e obtiveram excelentes resultados, quando a detecção por condutividade foi usada. Isso porque os ânions ftalatos e benzoatos têm condutividades menores do que os ânions a serem separados e detectados. Testes preliminares foram então realizados com sais de ácidos orgânicos fracos, como o ácido benzóico (pK_a 4,2) $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tamponado com o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ com, e também o ácido ftálico (pK_{a1} 3,1; pK_{a2} 5,4), $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tamponado com TRIS $4,8 \text{ mmol L}^{-1}$ [141]. O tampão de TRIS e seu ácido conjugado (o grupo amino protonado) possui boa estabilidade e elevada solubilidade em água. O TRIS não é higroscópico, não absorve CO_2 e é compatível com vários fluidos biológicos [142].

O valor do pK_a mede a força do ácido fraco e, conseqüentemente, seu grau de dissociação e, quanto mais alto for esse valor, mais fraco é o ácido. Via de regra, a dissociação é suprimida quando o pH é menor em $\text{pK}_a - 1$, sendo completa em $\text{pK}_a + 1$. As concentrações definidas anteriormente correspondem a um valor de pH 5,0 para as duas condições testadas. Nessa condição, pode-se assumir que o ácido benzóico está presente praticamente como benzoato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$).

No cromatograma da Figura 29, que mostra a separação de ânions nas colunas recheadas com a SilprPi- H_2O utilizando-se benzoato $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$, observa-se o pico de injeção (*) correspondendo ao sinal da fase móvel no detector, aumentado pela presença de outros íons na amostra injetada, que não participam do processo da separação, mas contribuem com acréscimo da condutividade. Nesse

mesmo cromatograma é possível identificar um segundo pico de sistema (pico 5), em torno de 10 minutos, após a eluição dos ânions injetados, mostrando uma diminuição da condutividade da fase móvel, gerado pelo deslocamento competitivo dos íons benzoato para ocupar os sítios ativos da fase estacionária. Nesse mecanismo, o volume total de FM que passa na coluna torna-se deficiente em íons benzoato, a condutividade decresce e o processo é traduzido com um pico negativo no cromatograma. Os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Tabela 7.

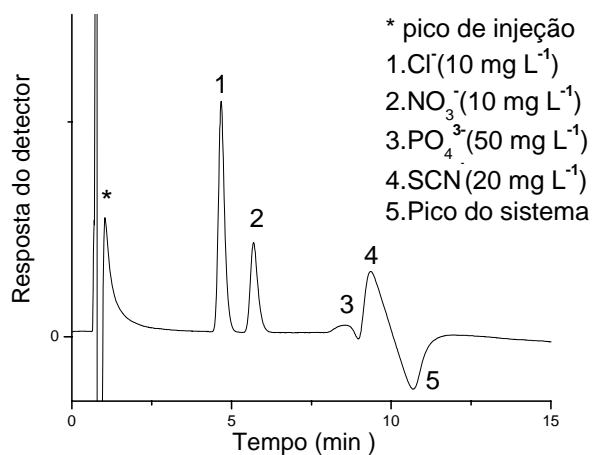


Figura 29 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido benzóico 4,0 mmol L⁻¹ / TRIS 3,5 mmol L⁻¹. Vazão: 1,5 mL min⁻¹; pH 5,0. Volume de injeção: 20 µL; Detector: condutividade.

Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O usando ácido benzóico 4,0 mmol L⁻¹ / TRIS 3,5 mmol L⁻¹ como fase móvel

Ânions	Parâmetros cromatográficos			
	k (min) ^a	N/m (m ⁻¹)	TF ^b	R _s
Cloreto	6,2	17700	1,3	--
Nitrato	7.7	17500	1,3	2,5
Fosfato	12	8600	0,85	4,1
Tiocianato	13	11500	1,5	0,86

^a t_M da coluna é o sinal da fase móvel no detector.

^b Fator de alargamento do pico a 5% de sua altura

O ácido benzóico, por ser um ácido mais fraco que o ácido ftálico, com força de eluição menor, propicia uma separação bastante seletiva para ânions monovalente quando se utiliza uma coluna de resina com grupo funcional de amônio quaternário ligado ao suporte [141]. Na SilprPi-H₂O, utilizando-se essas condições, os íons cloreto e nitrato eluem em tempos de retenção muito próximos, impossibilitando a separação em uma única corrida cromatográfica de nitrito e brometo que, de acordo com a ordem de seletividade para FE com grupos aminos ligados, deveriam ser eluídos entre o cloreto e o nitrato. Resultados obtidos por Gjerde et al. [143] em separações utilizando recheios de poliestireno entrecruzados, com grupos amino ligados, confirmam também que o ftalato é um eluente mais eficiente do que o benzoato na separação de diversos ânions porque com o benzoato, os tempos de retenção são mais longos.

A utilização de um tampão de ftalato / TRIS como fase móvel, Figura 30, mostra também a existência de dois picos de sistema: o pico de injeção presente praticamente em todas as separações por CTI, quando se usa fases móveis diluídas de ácidos orgânicos fracos, e um segundo pico (pico 5), dessa vez positivo, originado pela presença de ânions ftalato e biftalato na solução em pH 5,0.

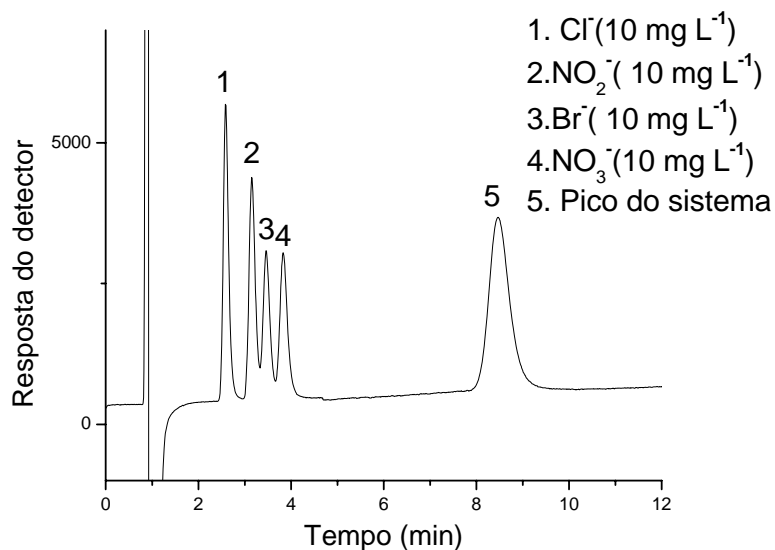


Figura 30 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,9 mmol L⁻¹; pH 5,0; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.

Pelo cromatograma da Figura 30, representando as condições de eluição descritas acima, observa-se que a separação não foi completa implicando em uma baixa eficiência e seletividade para os ânions injetados. Os valores obtidos para os parâmetros cromatográficos dessa separação são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 5,0 mmol L⁻¹ / TRIS 6,4 mmol L⁻¹; pH 5,0.

Ânions	Parâmetros cromatográficos			
	k ^a (min)	N/m (m ⁻¹)	TF ^b	R _S
Cloreto	2,3	14630	1,4	--
Nitrito	3,1	15590	-	2,4
Brometo	3,5	15640	-	1,1
Nitrato	4,0	16490	-	1,2

^a t_M da coluna é o sinal da fase móvel no detector.

^bFator de alargamento do pico a 5% de sua altura

Apesar do pico do sistema presente ser um interferente em potencial e a evidência de que alguns ânions eluem com tempos de retenção próximos, é possível, com ajustes da concentração e do pH da FM a obtenção de uma melhor resolução dos ânions presentes. Em uma análise cuidadosa dos cromatogramas obtidos nos testes preliminares, verificou-se que a FM composta de ácido ftálico / TRIS sugere ser uma condição mais promissora para a separação de um maior número de ânions com um tempo de análise menor e uma eficiência maior.

4.4.2.2 A Otimização da Concentração de Ácido Ftálico / TRIS

Uma vez selecionada a FM de ácido ftálico/ TRIS, as colunas foram então condicionadas com o tampão de ftalato e biftalato, cuja concentração representa 100 vezes a concentração da fase móvel de trabalho antes de iniciar o uso da própria FM. Com um condicionamento utilizando-se uma concentração de ftalato / biftalato de 50 vezes maior não se obteve bons resultados quanto à seletividade da separação. O uso dessa concentração elevada teve como objetivo garantir a troca efetiva entre o contra-íon cloreto e as espécies iônicas da FM. Esse processo de condicionamento é utilizado para colunas de metacrilato [144].

A escolha do tampão levou em consideração o tempo de vida da coluna, considerando que alguns tampões inorgânicos, tais como carbonatos e fosfatos, podem acelerar a dissolução da sílica [145]. Além disso, como o ácido ftálico é um ácido orgânico fraco e possui K_a elevada, o tampão de ftalato possui larga aplicação nas separações por troca iônica.

Um grande número de separações foram realizadas variando-se a concentração total do tampão de 2,5 a 10 mmol L⁻¹. Para estes experimentos foram injetados sempre uma mistura padrão em concentrações entre 5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ contendo os ânions cloreto, nitrito, brometo e nitrato que correspondem à seqüência de eluição observada nos cromatogramas (Figuras 31 e 32).

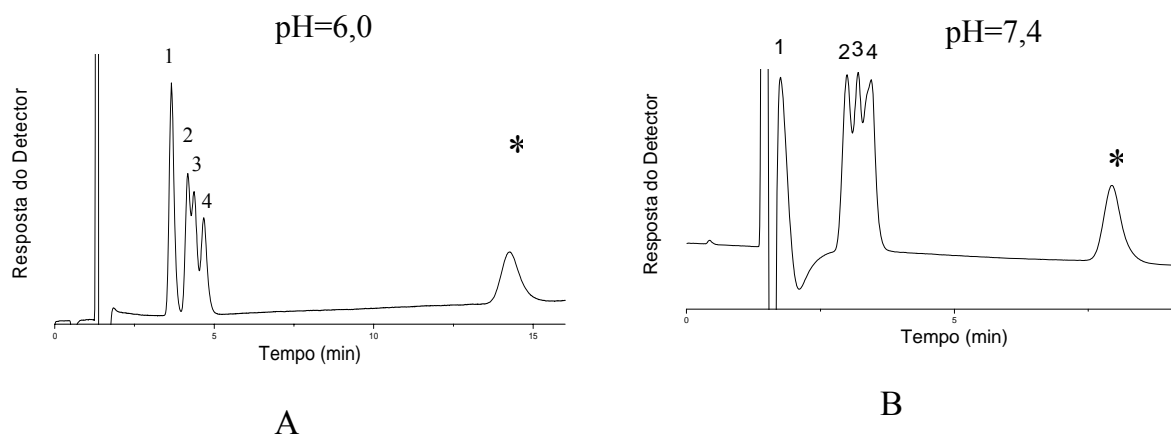


Figura 31 - Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O na separação de cloreto (1), nitrito (2), brometo (3), nitrato (4) e o pico do sistema (*). Condições cromatográficas: (A) FM: ácido ftálico 1,5 mmol L⁻¹/TRIS 1,44 mmol L⁻¹; vazão: 1,0 mL min⁻¹; (B) ácido ftálico 0,5 mmol L⁻¹ / TRIS 0,48 mmol L⁻¹; vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade

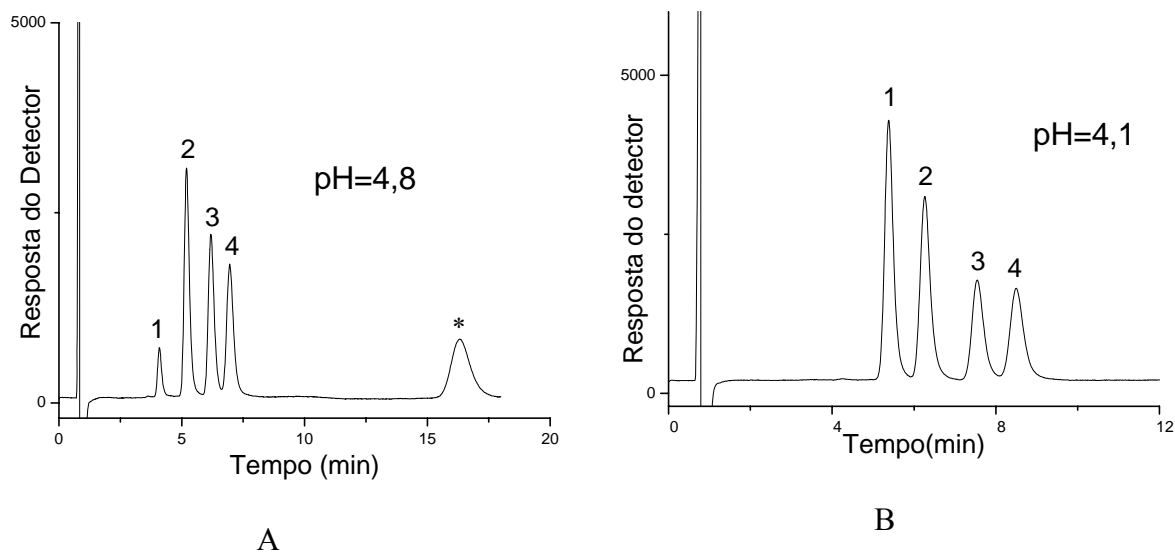


Figura 32 - Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O na separação de cloreto (1), nitrito (2), brometo (3), nitrato (4) e o pico do sistema (*). Condições cromatográficas: (A) FM: ácido ftálico 3,0 mmol L⁻¹; vazão: 1,5 mL min⁻¹; (B) ácido ftálico 3,0 mmol L⁻¹ / TRIS 2,9 mmol L⁻¹; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.

Os parâmetros cromatográficos obtidos para o cromatograma da Figura 32B são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O usando ácido ftálico 3,0 mmol L⁻¹ / TRIS 2,9 mmol L⁻¹ como fase móvel; pH 4,1.

Ânions	Parâmetros cromatográficos			
	k ^a	N/m	As ^b	Rs
Cloreto	7,5	20180	1,3	-
Nitrito	8,9	19920	1,3	2,1
Brometo	11	22060	1,2	2,6
Nitrato	12	21500	1,2	1,7

^a t_M da coluna é o sinal da fase móvel no detector.

^b Fator de alargamento a 5% da altura do pico.

Outra separação cromatográfica em condições semelhantes às da Figura 32B está apresentada na Figura 33. Os valores dos parâmetros cromatográficos dessa separação não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos da separação anterior, como pode ser visto na Tabela 10.

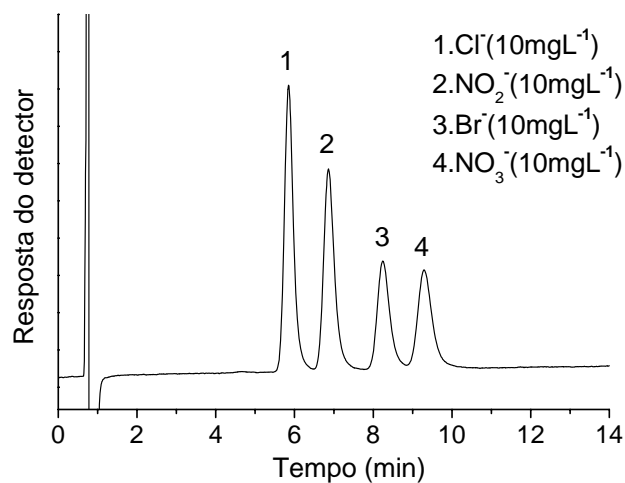


Figura 33 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions na coluna recheada com a fase estacionária SilprPi-H₂O usando ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹ como fase móvel; pH 4,2.

Ânions	Parâmetros cromatográficos				
	N/m	h	T _F ^b	k ^a	Rs
Cloreto	20 500	4,9	1,3	7,7	-
Nitrito	20 500	4,9	1,3	9,2	2,2
Brometo	21 600	4,6	1,4	11	2,6
Nitrato	22 100	4,5	1,3	13	1,7

^a t_M da coluna é o sinal da fase móvel no detector.

^b Fator de alargamento

Em concentrações maiores que 5,0 mmol L⁻¹ do tampão de ftalato observaram-se distorções na linha de base. Esse comportamento pode ser evidenciado no cromatograma da Figura 34, para uma concentração de FM tampão de 10 mmol L⁻¹.

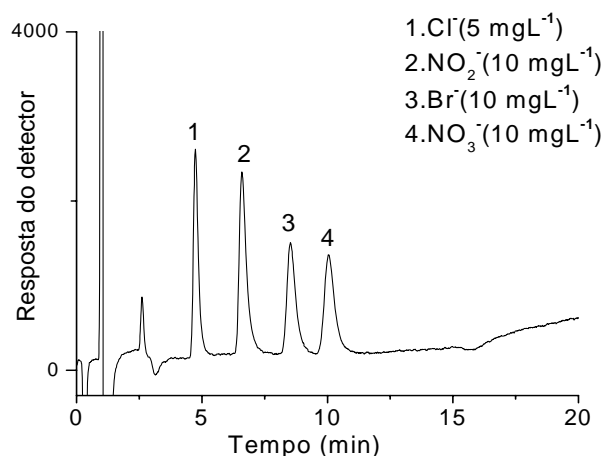


Figura 34 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE SilprPi-H₂O Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 10 mmol L⁻¹ / TRIS 10,2 mmol L⁻¹; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min⁻¹; volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade

É importante citar que, após a passagem de FM nessa concentração, a saída da coluna ficou obstruída, possivelmente devido à quebra de algumas partículas da

fase estacionária e ao aumento de pressão, inicialmente em 2,3 MPa (350 psi), e atingindo o valor de 10,6 MPa (1600 psi) em uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. A colocação do redutor e do filtro superior no ultra-som com metanol restabeleceu a pressão inicial, mas a separação excelente entre os seis ânions observada inicialmente não pode ser recuperada. Isso pode significar que, de alguma forma, a elevada concentração do tampão provocou a degradação da FE, como pode ser observado na Figura 35, que mostra uma separação realizada com esta coluna no pH 4,2 após o uso da coluna em pH e concentrações mais altas.

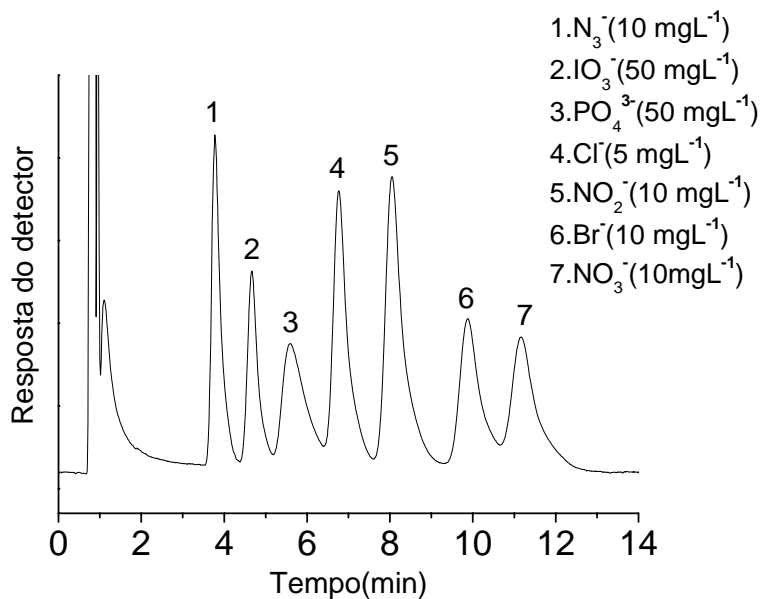


Figura 35 - Cromatograma obtido com a coluna recheada com a FE, SilprPi-H₂O, após o uso com altas concentrações de tampão. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; pH 4,2; vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detector: condutividade

4.4.2.3 Determinação da Eficiência Máxima da SilprPi-H₂O por CTI

Para determinar a vazão na qual a eficiência da coluna SilprPi-H₂O é máxima foi construída a curva da altura de prato, em função da vazão de FM (Figura 36) que passa na coluna pela injeção de uma mistura de ânions em diferentes vazões de FM, que variaram de 0,2 mL min⁻¹ até 1,5 mL min⁻¹. As curvas indicam a vazão ótima em torno de 0,4 mL min⁻¹ para os ânions da mistura. Com esse valor obtém-se a menor altura equivalente a um prato e, conseqüentemente, a maior eficiência.

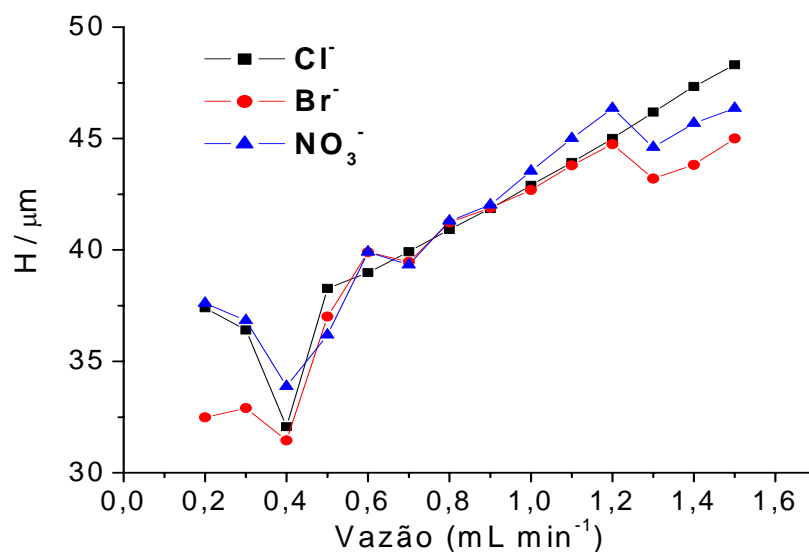


Figura 36 - Curvas de altura de prato para o cloreto, brometo e nitrato em diferentes vazões de fase móvel para a coluna de 150 x 3,9 mm recheada com a FE SilprPi-H₂O. Condições: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹. Volume de injeção: 20 μL. Detecção: condutividade.

Os valores mostrados na Tabela 11, que representam dados da Figura 36, indicam que o valor de eficiência máxima encontrado para a separação por troca iônica está em concordância com os resultados obtidos para os compostos orgânicos separados em FN. Esse experimento informa que, provavelmente, a separação de qualquer composto polar ou espécie iônica terá um maior número de pratos, quando a vazão é menor permitindo mais tempo de interação das espécies com a FE.

Pode se observar pelos dados da Tabela 11 que, para os três ânions injetados, o fator de retenção (k) cai vertiginosamente entre vazões de 0,2 mL min⁻¹ à 0,5 mL min⁻¹, mantendo-se praticamente constante após uma vazão de 0,7 mL min⁻¹.

Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos para os ânions Cl⁻, Br⁻ e NO₃⁻ em diferentes vazões de FM.

Vazão (mL min ⁻¹)	N /m Cl ⁻	k Cl ⁻	N /m Br ⁻	k Br ⁻	N /m NO ₃ ⁻	k NO ₃ ⁻
0,2	27733	18,8	32787	22,9	26587	25,6
0,3	26473	11,6	30400	14,2	29520	16
0,4	32000	7,49	30793	9,21	27147	10,4
0,5	26127	5,46	27020	6,78	27633	7,68
0,6	25653	5,30	25067	6,59	25060	7,47
0,7	25053	4,19	25340	5,25	25600	5,98
0,8	24440	4,48	24187	5,60	24213	6,37
0,9	23893	4,65	23873	5,81	23800	6,60
1,0	23307	4,63	23427	5,78	22967	6,57
1,1	22767	5,78	22833	5,97	22220	6,77
1,2	22220	4,76	22347	5,94	21573	6,75
1,3	21653	4,95	23147	6,17	22420	7,01
1,4	21127	4,74	22820	5,92	21887	6,72
1,5	20700	4,42	22220	5,54	21573	6,30

4.4.2.4 Teste de Estabilidade da FE SilprPi-H₂O

Nas separações por troca iônica é prática comum o uso de uma coluna de sacrifício, também chamada de coluna de saturação, colocada entre a bomba e a válvula de injeção. Entretanto, aqui essa precaução foi omitida, fazendo-se os experimentos sem nenhuma proteção aos possíveis impactos que a coluna pudesse sofrer. Devido a falta dessa proteção, dependendo do experimento a ser realizado, a coluna pode rapidamente apresentar alguns sinais de degradação.

Sendo assim, o objetivo do teste de estabilidade é produzir dados quantitativos que demonstre a estabilidade da sílica propilpiridínio na presença do

tampão otimizado para as separações. A estabilidade da FE SilprPi-H₂O foi avaliada pela injeção periódica de uma mistura padrão de cloreto e nitrato em concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹, respectivamente. Esta avaliação também foi acompanhada pela injeção de uma amostra de referência, a CRM 409, com valores de íons cloreto de 4,0 mg L⁻¹ e íons nitrato de 4,8 mg L⁻¹. O teste foi realizado pela passagem contínua de FM chegando-se até 25000 volumes de coluna.

Durante o teste, a reciclagem do eluente, prática comum em alguns laboratórios, que poderia ter algum efeito protetor sobre a coluna, também não foi utilizada. Durante o dia, a FM (ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹) foi bombeada a 0,8 mL min⁻¹. Durante a noite, a FM foi bombeada através da coluna a uma vazão de 0,1 mL min⁻¹ com o propósito de criar um ambiente ainda mais agressivo à FE.

No período em que a coluna esteve em contacto com a FM passando continuamente, cerca de cinco semanas, as injeções foram realizadas pela manhã e à tarde em uma vazão de 0,8 mL min⁻¹, sempre em duplicata, seguidas de uma injeção da amostra de referência.

Para uma avaliação das modificações sofridas pela coluna ao longo desse período, fez-se o acompanhamento dos parâmetros cromatográficos de eficiência (N/m), fator de retenção (k) e fator de assimetria de pico (As), cujos valores, dispostos na forma de gráficos (Figura 37), referem-se aos ânions cloreto e nitrato presentes na mistura de padrões e também na amostra de referência.

Um ponto importante a ser abordado é que a primeira injeção para a tomada dos parâmetros cromatográficos foi efetuada quando já havia passado 460 volumes de coluna de FM, correspondendo ao volume necessário para o condicionamento com a FM mais concentrada e um posterior restabelecimento do equilíbrio da coluna e da linha de base com a FM de trabalho.

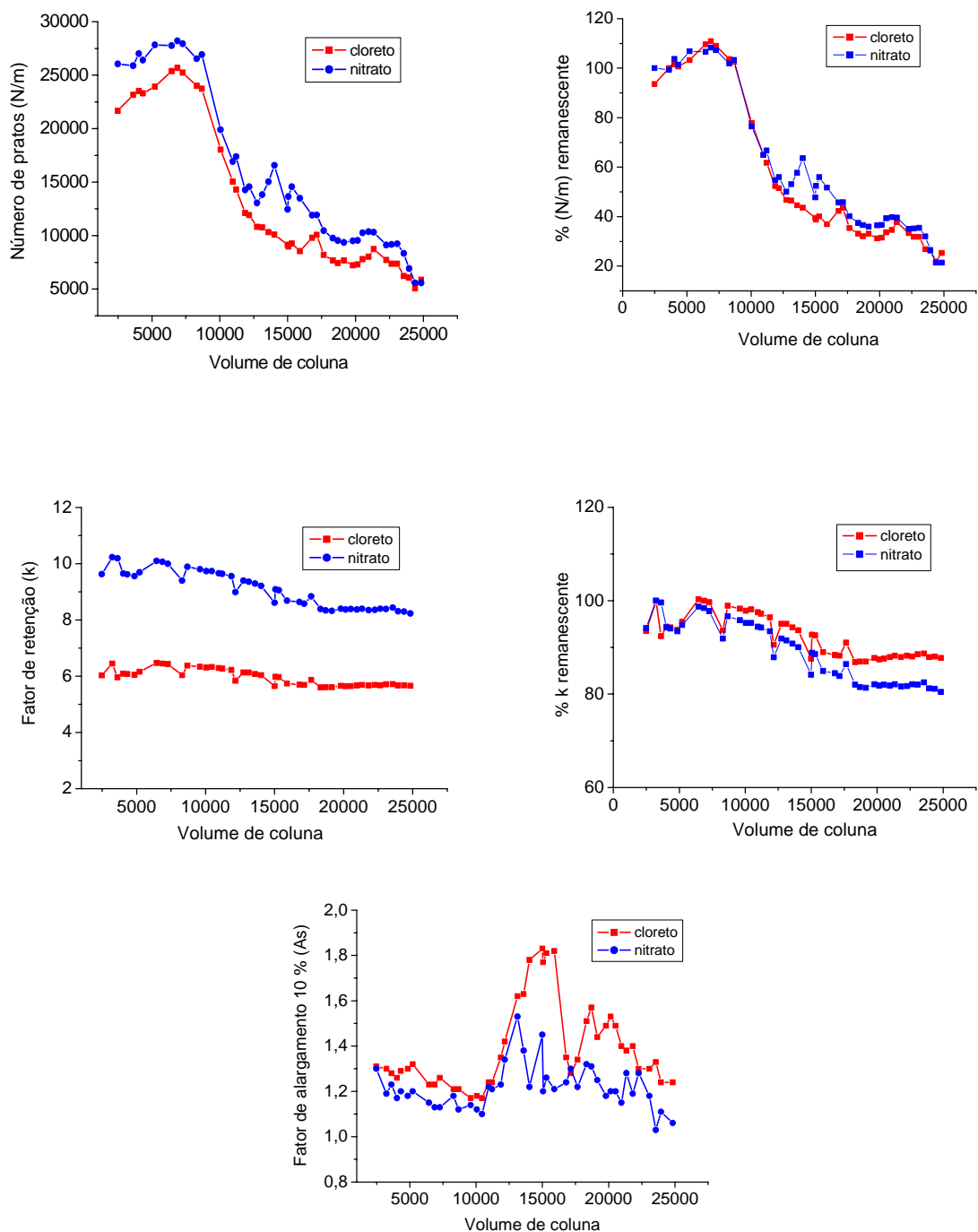


Figura 37 - Parâmetros cromatográficos obtidos durante o teste de estabilidade da FE SilprPi-H₂O. Coluna: 60 X 3,9 mm. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; pH 4,1; vazão: 0,8 mL min⁻¹ (dia) e 0,1 mL min⁻¹ (noite). Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. Amostra de referência CRM409 - água de chuva.

A Figura 37 mostra o desempenho cromatográfico da FE SilprPi-H₂O na análise de uma amostra de referência da Comunidade Européia CRM409, contendo os ânions cloreto e nitrato, durante o teste de estabilidade. Através da análise dessas figuras verifica-se que os fatores de retenção para os ânions escolhidos nesse teste sofreram um decréscimo no fator de retenção de 15 % e 23 % para os ânions cloreto e nitrato, respectivamente, que é uma redução relativamente pequena.

Os valores mais altos de eficiência foram obtidos na 32^a injeção, correspondendo ao nono dia da passagem contínua da FM, com 6828 volumes de coluna (4890 mL). Esses dados reforçam ainda mais a necessidade de um bom condicionamento na coluna SilprPi-H₂O e, em adição, o tempo que leva o detector de condutividade apresentar uma linha de base estável, que é em torno de 1,5 horas.

Mudanças mais proeminentes ocorreram na eficiência entre 8500 e 12000 volumes de coluna (6080 mL e 8600 mL) quando se observa uma queda contínua na eficiência, acompanhado por uma acentuado aumento no fator de assimetria. É importante citar que, após a passagem de aproximadamente os 12000 volumes de FM, a saída da coluna ficou obstruída, devido provavelmente à quebra das partículas da fase estacionária com o conseqüente aumento da pressão. A colocação do redutor e do filtro superior no ultra-som com metanol restabeleceu a pressão inicial e o fator de assimetria voltou ao normal quando a eficiência atingiu outro patamar. Por outro lado, não ocorre mais uma separação suficiente para a quantificação.

Uma melhor visualização do comportamento da coluna SilprPi-H₂O é visto na Figura 38 que mostra os cromatogramas da separação de cloreto e nitrato no início do teste de estabilidade e após a passagem de aproximadamente 25000 volumes de Fase Móvel.

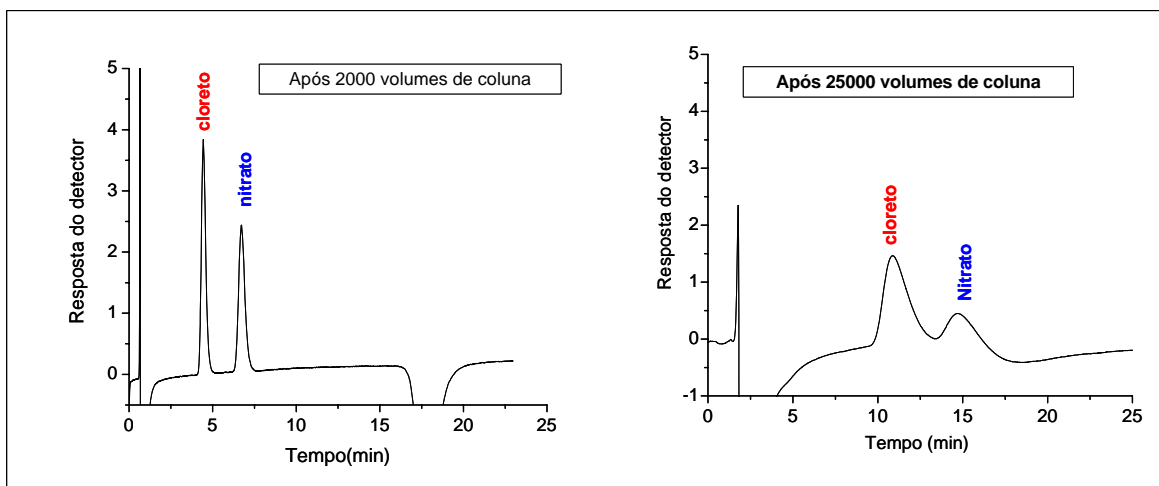


Figura 38 – Cromatogramas obtidos durante e depois do teste de estabilidade com a FE SilprPi-H₂O. Coluna: 60 x 3,9 mm Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; pH 4,2;; Mistura teste: 1 – cloreto; 2 – nitrato.

4.4.2.5 Efeito do pH Sobre a Retenção dos Ânions

Os valores de pH da fase móvel também foram variados de 3,8 a 7,0. Valores de pH menores do que 3,8 não foram utilizados para evitar que ocorresse a hidrólise dos grupos siloxanos e, conseqüentemente, a perda da fase ligada. Não se obteve uma separação completa dos ânions testados quando foi usada uma fase móvel com valor de pH 3,8. Em valores de pH entre 4,5 e 6,0, foram observados picos do sistema. Essa condição não foi favorável à separação, pois esses picos são interferentes na determinação de alguns ânions de interesse. Por outro lado, em valores de pH 6,0 foi possível separar sulfato e tiocianato com boa eficiência. Em pH 7,0, embora a concentração do tampão seja bastante baixa, a resolução foi totalmente perdida.

Um teste do comportamento da fase estacionária da SilprPi-H₂O em diferentes valores de pH da FM na concentração de ftalato otimizada, foi realizada com uma coluna de 60 x 3,9 mm em uma vazão da FM de 0,8 mL min⁻¹. O efeito do pH sobre a retenção de ânions inorgânicos foi observado na faixa de 3,8 a 6,6 em uma concentração fixa do ftalato. Os pH foram ajustados com TRIS em diferentes concentrações. Os três primeiros picos nos cromatogramas da Figura 39 referem-se

aos ânions cloreto, nitrito e nitrato, respectivamente, e o quarto pico representa um pico do sistema referente ao componente da fase móvel presente entre pH 4,6 e 5,45. Nesses pH, tem-se o anfótero biftalato que a depender do pH da FM juntamente com o ftalato formam um pico do sistema, já observado no cromatograma da Figura 34 em FM tampão de pH 5,0.

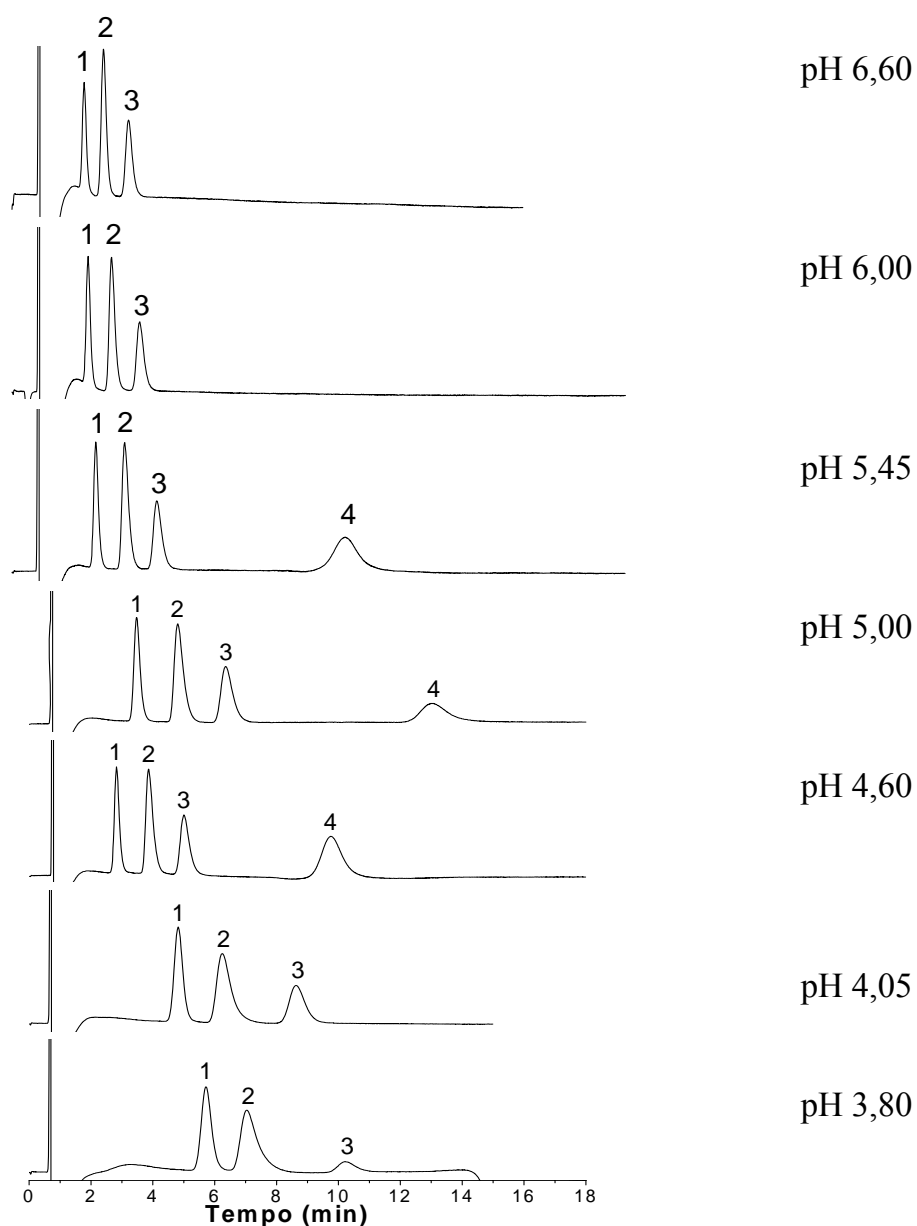
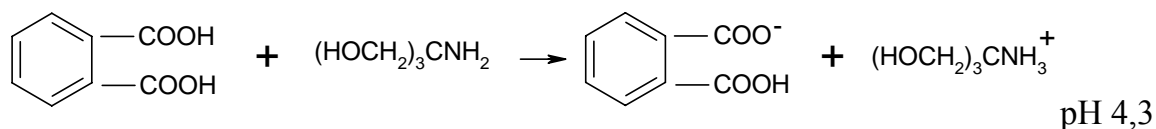


Figura 39 - Cromatograma obtido com a coluna de 60 x 3,9mm, recheada com a FE SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade. Mistura: 1 – cloreto; 2 – nitrito; 3 – nitrato, 4 – pico do sistema.

Os tempos de retenção para os ânions da mistura padrão são mostrados na Tabela 12. Em valores mais baixos de pH predomina na FM a forma de hidrogenoftalato, enquanto em valores mais altos há maior quantidade do ânion biftalato, divalente. Os resultados indicam que uma eluição muito mais rápida é obtida com o predomínio do ânion divalente na FM. Esse efeito também é observado em FE de poliestireno com grupos aminos ligados ao suporte [143]. Através desse experimento, pode-se verificar em que valores de pH a presença do pico do sistema interfere na separação dos ânions.

A melhor separação foi alcançada usando-se um tampão de ftalato 2,5 mmol L⁻¹, em pH 4,2, como já visto na Figura 33. O pH do ácido ftálico nessa concentração é 2,9. Através dos cálculos de pH de tampão verifica-se que seriam necessários 2,5 mmoles L⁻¹ de TRIS para reagir todo o ácido ftálico na primeira ionização, conforme a reação:



Se adicionar quantidade suficiente do tampão TRIS para reagir até o segundo ponto de equivalência, tem-se um pH de 9,68, o qual não é adequado à fase estacionária que está sendo utilizada. Para o valor de pH 4,2 na fase móvel tem-se presente os ânions ftalatos e biftalatos, resultando em pico do sistema positivo, que poderão ser interferentes na separação de alguns dos analitos da amostra.

Tabela 12 - Parâmetros cromatográficos obtidos para o Cl^- , NO_2^- , e NO_3^- com a SilprPi- H_2O em diferentes pH da fase móvel tampão de ftalato $2,5\text{mmol L}^{-1}$.

pH	Ânion	$t_r(\text{min})$	Área	Altura Pico	k	N/m	As	Rs	α
3,80	1	5,7	16161	688	8,7	22267	1,2		
	2	7,0	18628	494	11	13133	1,7	1,6	0
	3	10	2908	81	16	30467	--	3,3	3,4
4,05	1	4,8	15431	778	7,2	22233	1,2		
	2	6,2	18683	568	9,6	13550	1,6	2,3	0
	3	8,6	11180	312	14	21783	1,3	2,6	2,7
4,17	1	5,3	15437	723	7,4	23350	1,4		
	2	7,2	18896	601	10	19467	1,8	2,6	0
	3	10	9121	218	15	22783	1,6	3,2	2,7
4,60	1	3,5	12315	856	4,5	21933	1,3		
	2	4,8	17040	809	6,6	19567	1,6	2,8	0
	3	6,4	12369	461	9,1	21183	1,5	2,4	2,2
5,00	1	2,8	9967	872	3,0	22967	1,3		
	2	3,9	14177	861	4,5	20667	1,3		
	3	5,0	10286	492	6,1	21567	1,4	2,3	2,1
5,45	1	2,5	8422	855	2,5	23583	1,3		
	2	3,3	12032	862	3,7	21183	1,5	2,7	0
	3	4,3	8020	463	5,1	22733	1,4	2,3	2,1
6,00	1	2,2	7531	868	2,2	25050	1,3		
	2	2,9	10797	905	3,2	22717	1,4	2,5	0
	3	3,8	6926	463	4,3	23750	1,4	2,3	2,2
6,60	1	2,1	16161	688	1,9	22267	1,2		
	2	2,7	6075	730	2,7	24483	1,3		
	3	3,4	7109	518	3,7	23417	1,3	2,3	2,3

Legenda: 1 = cloreto; 2 = nitrito; 3 = nitrato.

4.5 Exploração de Possíveis Aplicações.

4.5.1 Separação de Diversos ânions

Outras separações, envolvendo alguns ânions orgânicos e inorgânicos, foram realizadas utilizando a composição de fase móvel aprimorada. Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 40, 41 e 42.

No cromatograma da Figura 40 verifica-se que os ânions da mistura padrão injetada são eluídos, em um tempo de análise de 12 minutos, com fator de alargamento e resolução dentro dos limites permissíveis e excelente seletividade.

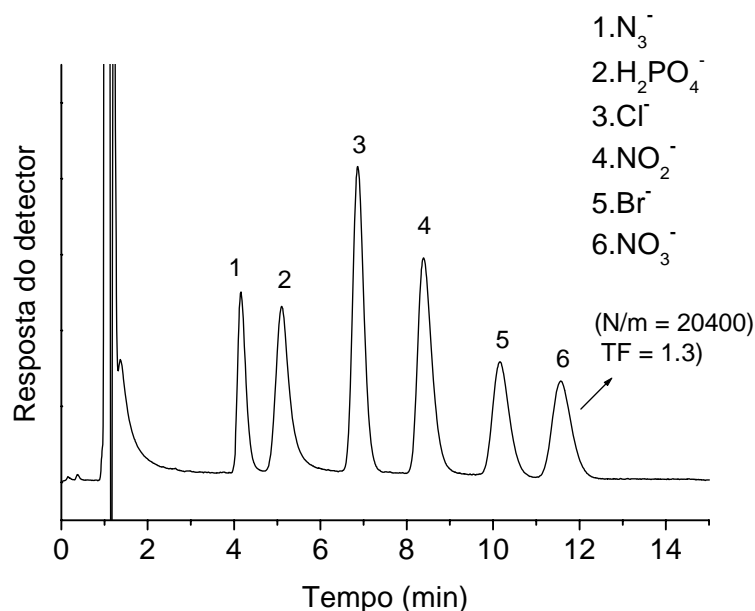


Figura 40 – Separação de uma mistura de ânions inorgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade

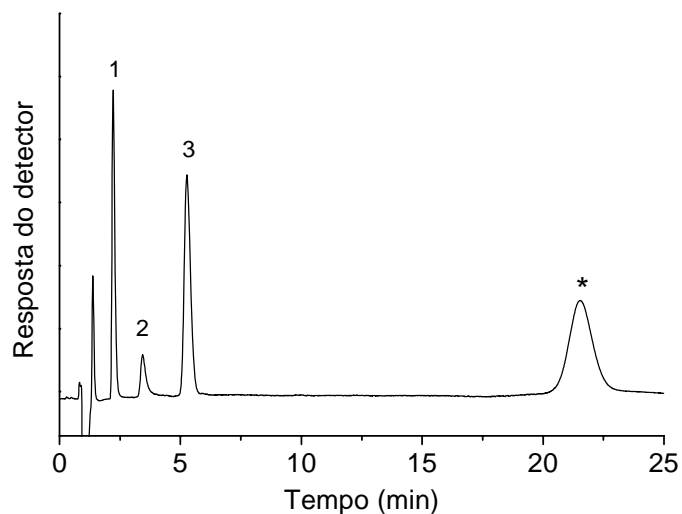


Figura 41 - Separação de ânions orgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μL. Detecção: condutividade. Mistura de ânions: 1 acetato ; 2 lactato; 3 succinato; * “pico do sistema”.

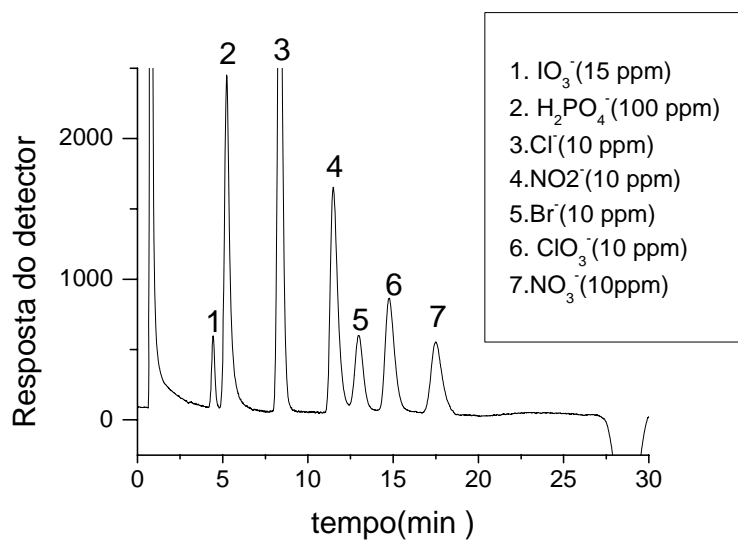


Figura 42 -. Separação de ânions inorgânicos. FE: SilprPi-H₂O. Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μL. Detecção: condutividade.

A aplicabilidade dessa nova fase estacionária para troca aniônica foi explorada na separação de cloreto e nitrato em uma amostra de referência ambiental, obtida da Comunidade Européia (Figura 43).

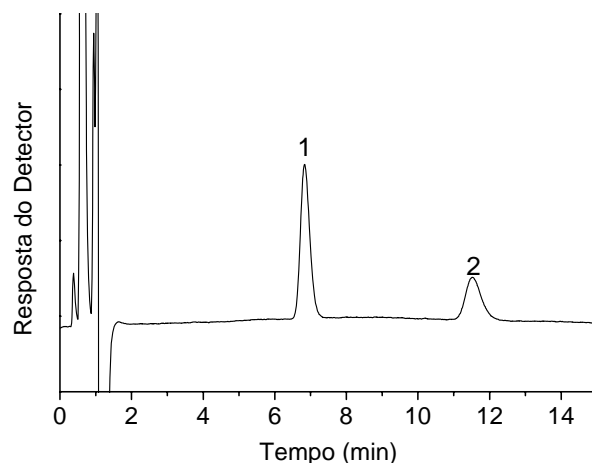


Figura 43 – Separação de uma amostra ambiental. FE: SilprPi-H₂O. Mistura de ânions: 1 cloreto ; 2 nitrato. Amostra: água de chuva (amostra de referência da Comunidade Européia). Condições cromatográficas: FM: ácido ftálico 2,5 mmol L⁻¹ / TRIS 2,4 mmol L⁻¹; vazão: 1,3 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: condutividade.

4.5.2 Quantificação dos Ânions

Alguns ânions foram separados e quantificados usando o método desenvolvido, com detecção por condutividade sem supressão. Esses ânions foram escolhidos por terem dado uma excelente resposta em relação à seletividade. A construção da curva analítica foi baseada na concentração nominal do padrão e a área sob o pico, obtida experimentalmente. Os valores de área obtidos para construção da curva analítica foram nos tempos de retenção, utilizando a metodologia otimizada, de 2,33 min para o cloreto, 8,11 min para o nitrito, 9,82 min para o brometo e 11,07 min para o nitrato.

Para preparar a curva analítica e determinar os limites de detecção (LD) dos ânions injetaram-se padrões cobrindo uma faixa de 0,10 mg L⁻¹ à 10 mg L⁻¹, com intervalos de concentração de 0,05 mg L⁻¹. Para o limite de detecção, utilizou-se o

método visual, de tal modo que se pudesse distinguir entre ruído e sinal analítico estabelecendo-se a menor concentração visível (detectável). A partir dos resultados foram construídas as curvas analíticas dos diversos ânions, conforme é mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos após regressão linear para coluna SilprPi-H₂O

Parâmetros da Curva Analítica				
Ânions	Faixa de conc. ^a (mg L ⁻¹)	Equação de regressão	r ^b	LD(mg L ⁻¹)
Cloreto	0,25 - 10	Y=1579,8 x + 22,0	0,9999	0,04
Nitrito	0,40 - 10	Y=918,7 x + 179,3	0,9990	0,17
Brometo	0,70 - 10	Y=504,3x + 16,0	0,9987	0,20
Nitrato	0,90 - 10	Y=530,4x + 158,4	0,9991	0,24

^a Foram usados 8 pontos para a construção da curva.

^b r = Coeficiente de correlação linear

Foi realizada também uma comparação entre uma curva analítica obtida com a coluna SilprPi-H₂O e uma curva analítica obtida com uma coluna polimérica, comercializada pela Shimadzu (IC-A1), que tem um grupamento de amônio quaternário ligado ao suporte. As Figuras 44 e 45 mostram os resultados obtidos neste experimento.

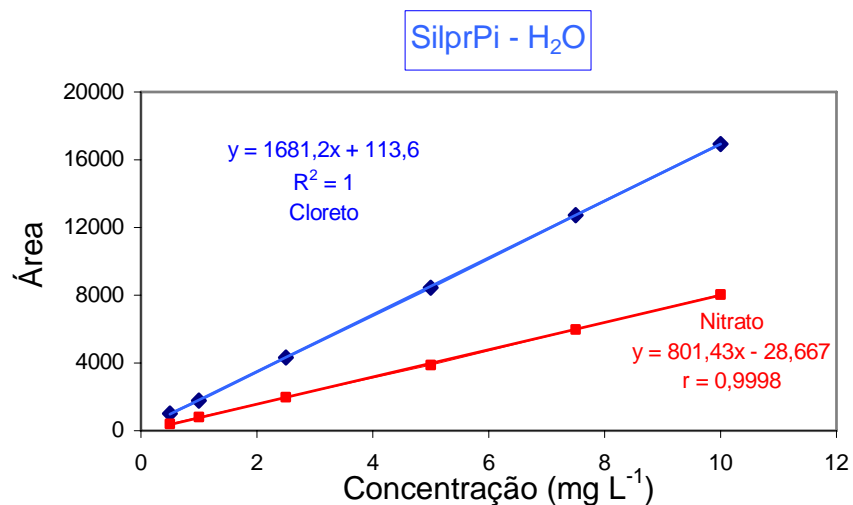


Figura 44 – Curva analítica para cloreto e nitrato utilizando a coluna SilprPi-H₂O

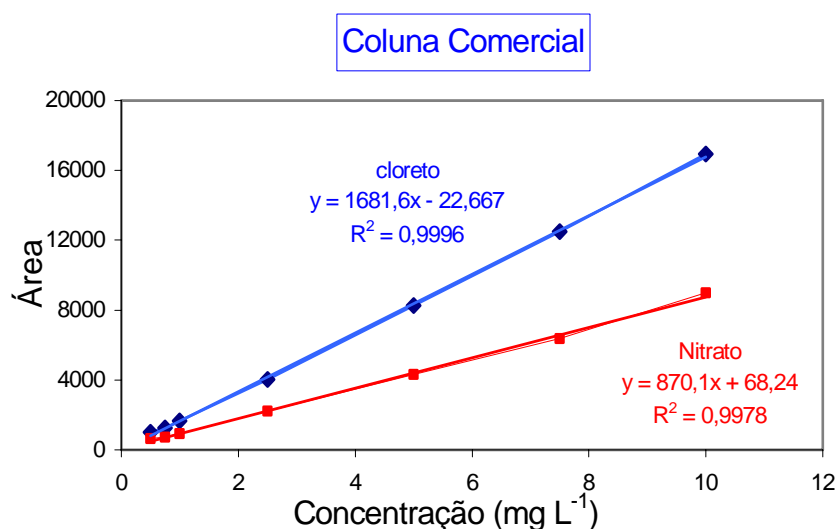


Figura 45 - Curva analítica para cloreto e nitrato em uma coluna polimérica com grupamento funcional de amônio quaternário.

O objetivo deste estudo foi situar essa nova FE desenvolvida, no universo de colunas já comercializadas para a análise de ânions. A coluna polimérica utilizada para essa comparação atende à análise de amostras ambientais de diversos ânions em baixos teores.

Para referenciar ainda mais essa nova FE, utilizou-se neste estudo comparativo duas amostras de referência da comunidade europeia, a AR408 e a AR409, com diferentes concentrações de cloreto e nitrato, simulando uma amostra de água de chuva. Essas amostras possuem diversos ânions e cátions em sua composição, podendo-se verificar dessa maneira a seletividade da nova fase.

As Tabelas 14 e 15 mostram os resultados obtidos para cloreto e nitrato nas duas amostras de referência certificadas que foram injetadas nas duas colunas de diferentes suportes cromatográficos.

Tabela 14 - Comparação dos resultados obtidos para o ânion cloreto nas amostras de referência AR408 e AR409

		Cloreto			
Amostra de Referência	Concentração Nominal (mg L ⁻¹)	SilprPi-H ₂ O		IC-A1	
		Concentração Experimental (mg L ⁻¹)	Taxa de Recuperação (%)	Concentração Experimental (mg L ⁻¹)	Taxa de Recuperação (%)
AR408	2,40	2,42	101	2,55	106
AR409	4,00	4,07	102	4,17	104

Tabela 15 - Comparação dos resultados obtidos para o ânion nitrato nas amostras de referência AR408 e AR409

		Cloreto			
Amostra de Referência	Concentração Nominal (mg L ⁻¹)	SilprPi-H ₂ O		IC-A1	
		Concentração Experimental (mg L ⁻¹)	Taxa de Recuperação (%)	Concentração Experimental (mg L ⁻¹)	Taxa de Recuperação (%)
AR408	1,25	1,58	126	1,24	99
AR409	4,8	4,7	98	4,70	98

Através desses materiais, cuja quantidade de analito é previamente conhecida, pode-se estimar o fator de recuperação R definido como a proporção da quantidade

de analito presente na porção analítica do material teste. Neste trabalho, as medidas foram realizadas considerando a expressão:

$$R (\%): \frac{\text{média do valor obtido} \times 100}{\text{Valor teórico do padrão}}$$

Este valor pode ser de 50% a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ dependendo da complexidade analítica e do tipo de amostra a ser analisada [146].

5 CONCLUSÕES

Uma nova fase estacionária para cromatografia por troca aniônica, com grupos propilpiridínio, foi preparada através da silanização da sílica com o 3-cloropropiltrimetoxissilano, na presença de água seguida pela reação com a piridina. Através das diversas técnicas utilizadas para caracterizar física e quimicamente o material obtido nas duas etapas da síntese, constatou-se que a adição de uma pequena quantidade de água na etapa de silanização permitiu a formação de uma camada polimérica, melhorando a cobertura da superfície da sílica. Esta polimerização foi o diferencial quando comparada à síntese realizada em meio anidro. Em face disso, a separação dos ânions, com boa resolução, somente foi alcançada na fase sintetizada em presença de água. Esses resultados mais promissores foram obtidos em função de um maior número de grupamentos piridínicos na superfície dessa fase estacionária, que foi evidenciado pelos cálculos do grau de recobrimento através dos dados de análise elementar e também pela maior perda de massa da SilprPi- H₂O na análise termogravimétrica. Na comparação dos espectros de RMN de ²⁹Si para as duas fases sintetizadas, observou-se claramente a redução dos silanóis livres, indicando um maior grau de entrecruzamento durante a reação de sililação realizada em presença de água.

A capacidade de troca iônica, determinada pelo método k_0 , mostrou que a nova fase sintetizada em presença de água possui mais sítios trocáveis do que a fase obtida em meio anidro. É relevante ter conhecimento de que os dados obtidos estão de acordo com os dados reportados na literatura para a sílica cloropropilpiridínio.

Muitas variáveis foram testadas para a escolha dos parâmetros metodológicos: o mais importante foi definir uma fase móvel tampão com um pH intermediário de forma a minimizar os picos do sistema. Também foi selecionada uma vazão maior, diminuindo o tempo de retenção dos analitos. Nessa vazão, foi obtida uma melhor linha de base no cromatograma. Na vazão ótima, determinada

pela curva de van Deemter, os analitos ficaram muito retidos, levando longos tempos para serem eluídos e produzindo picos largos, difíceis de serem quantificados, o que praticamente inviabilizou a análise cromatográfica desses analitos. A FE SilprPi-H₂O também exibiu boa estabilidade até cerca de 12000 volumes de coluna correspondendo a mais de 300 corridas cromatográficas de 15 minutos.

Os resultados obtidos foram bastante promissores, considerando que foi o primeiro trabalho no grupo de pesquisa que desenvolveu uma fase quimicamente ligada com grupamento propilpiridínio para cromatografia de íons, utilizando a sílica como suporte. Os valores de eficiência apresentados e de outros parâmetros cromatográficos mostraram que a fase estacionária denominada SilprPi pode ser aplicada à separação de íons orgânicos e inorgânicos.

Para situar o desempenho da SilprPi na quantificação de alguns ânions no universo de colunas cromatográficas comercialmente disponíveis para troca iônica, fez-se um estudo comparativo com uma coluna comercial a base de polímero, através da construção de uma curva analítica. As duas colunas, submetidas às mesmas condições, forneceram resultados semelhantes quanto à quantificação. Os valores de LD e LQ obtidos são adequados à análise de amostras ambientais.

Muitos caminhos ainda podem ser testados e avaliados para uma melhor resposta dessa fase estacionária quanto à estabilidade e à separação dos analitos de interesse. Como proposta de continuidade deste trabalho, a modificação da sílica cloropiridínio poderia ser realizada em uma única etapa. Isto significaria sintetizar primeiramente um novo silano partindo-se da reação do 3-cloropropiltrimetoxissilano com a piridina e assim formar o grupo cloropiridínio na molécula do agente sililante. Em uma segunda etapa o agente sililante seria imobilizado na superfície da sílica empregando-se as mesmas condições de reação já utilizadas.

Uma outra alternativa para a elaboração de uma nova fase estacionária para aplicação em Cromatografia de Íons seria modificar a sílica com o silano

aminopropiltrimetoxissilano e posteriormente fazer uma reação de metilação com os grupos -NH_2 imobilizados na superfície da sílica para formar os grupos $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_2$, que serão responsáveis pela troca aniônica. Essa reação baseia-se no processo clássico de alquilação de aminas empregando o iodeto de metila.

A fase estacionária SilprPi foi preparada com partículas de sílica com $10\ \mu\text{m}$, entretanto, esta mesma fase pode ser sintetizada com partículas esféricas de $7\ \mu\text{m}$ ou $5\ \mu\text{m}$, que conseqüentemente pode apresentar um melhor desempenho cromatográfico.

No que diz respeito à separação, outras metodologias podem ser aplicadas testando-se diferentes tampões como fases móveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SMALL, H. **Ion Chromatography**. New York: Plenum. 1989. 276 p.
- [2] LUCY, C.A. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p. 711, 2003.
- [3] KHYM, J.X. **Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1974. 256 p.
- [4] SETTLE, F. A. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 36A, 2002.
- [5] BOYD, G. E., SCHUBERT, J., ADAMSON, A. W. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, p. 2818, 1947.
- [6] TOMPKINS, E. R., KHYM, J. X. , COHN, W. E. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, p.2769, 1947.
- [7] SPEDDING, F. H., VOIGHT, A.F., GLADROW, E.M. and SLEIGHT, N. R. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, p. 2777, 1947.
- [8] KEIL, A. A. **Radiation Control for Fire and Other Emergency Forces**. Boston: National Fire Protection Association, 1960. 241p.
- [9] KNOLL, G. F. **Radiation Detection and Measurement**, New York: Wiley, 2000. 816 p.
- [10] HELLERICH, F. **Ion Exchange**, New York: McGraw-Hill, 1962, 624p.
- [11] INCZÉDY, J., **Analytical Applications of Ion Exchangers**, Oxford: Pergamon Press, 1966. 443p.
- [12] WALTON, H. F. **Reviews on Ion Exchange**, publicado bianalmente no **Analytical Chemistry**, (1966-1980)
- [13] OSBORN, G. H. **Analyst**, v. 78, p. 221, 1953.
- [14] FRITZ, G. F., PIETRZYK, D. J. **Talanta**, v. 8, p. 143, 1961.
- [15] GJERDE, D. T., FRITZ, J. S. **Ion Chromatography**, 2nd ed. Heidelberg: Hüthig, 1987. 283 p.
- [16] MOORE, S., STEIN, W.H. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, p. 663, 1951.
- [17] COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de**

Cromatografia, Editora Unicamp, Campinas, 2006, 453p.

- [18] HAMILTON, P. B. **Analytical Chemistry**, v. 32, p. 1779, 1960.
- [19] HAMILTON, P. B. **Analytical Chemistry**, v. 35, p. 2055, 1963.
- [20] HORVATH, C. E., LIPSKY, S. R. **Nature** v.211, p.248, 1966.
- [21] ETTRE, L.S. “1991: A Year of Anniversaries in Chromatography – Part 2: GLPC and HPLC”, **American. Laboratory.**, v. 24, n.18, p.15, 1992.
- [22] NEUE, U. D. **HPLC Columns: Theory, Technology and Practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 416 p.
- [23] SALMON, Y. E. **Pure and Applied Chemistry**, v. 25, p. 797, 1971.
- [24] KIRKLAND, J. J. **Modern Practice of Liquid Chromatography**. New York: Wiley-Interscience, 1971. 454 p.
- [25] ZWEIG, G. **Analytical Chemistry**, v. 44, p. 42R, 1972.
- [26] WALTON, H. F. **Analytical Chemistry**, v.46, p. 398R, 1974.
- [27] SEYMOR, M. D., FRITZ, J. S. **Analytical Chemistry**, v. 45, p. 1394, 1973.
- [28] FRITZ, J. S., STORY, J. N. **Analytical Chemistry**, v. 46, N° 7 p. 825, 1974.
- [29] VERPOORTE, R., SVENDSEN, A.B. **Journal of Chromatography**, v. 100, p. 227, 1974.
- [30] FRITZ, J. S., GJERDE, D. T., POHLAND, C. **Ion Chromatography**. Heidelberg: Hüthig, 1982. 203 p.
- [31] SMALL, H., STEVENS, T. S., BAUMAN, W. C. **Analytical Chemistry**, v. 11, N° 47, p. 1801, 1975.
- [32] HADDAD, P. R., JACKSON, P. E., SHAW M. J. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 725, 2003.
- [33] WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography**. Weinheim: Wiley, 2005. 931 p.
- [34] SMALL, H. **Journal of Chromatography A**, v. 546, p. 3, 1991.
- [35] SARZANINI, C. **Journal of Chromatography A**, v. 850, p. 213, 1999.
- [36] SARZANINI, C. **Journal of Chromatography A**, v. 956, p. 3, 2002.
- [37] SARZANINI, C., BRUZZONITI, M. C. **Trends in Analytical Chemistry**, v.20, p. 304, 2001.

- [38] KAISER, E. Q., DE BORBA, B. M., ROHRER, J. S. **American Laboratory**, v.35, n. 23, p. 16, 2003.
- [39] HADDAD, P. R., JACKSON, P. E., **Ion Chromatography, Principles and Applications**, Amsterdam: Elsevier, 1990. 776p.
- [40] DEGUCHI, K., ITO, M. **Journal of Chromatography A**, v. 845 p. 165, 1999.
- [41] JENKE, D.R., PAGENKOPH, G.K. **Analytical Chemistry**, v. 55, p.1168, 1983.
- [42] YAMAMOTO, M., YAMAMOTO, H., YAMAMOTO, Y., MATSUSHITA, S., BABA, N., IKUSHIGE, T. **Analytical Chemistry**, v.56, p.832, 1984.
- [43] SMALL, H., MILLER Jr., T.E. **Analytical Chemistry**, v.54, p. 462, 1982.
- [44] ISHANDARANI, Z., MILLER Jr, T.E. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 1591, 1985.
- [45] PIETRZYK, D.J., BROWN, D.M., **Analytical Chemistry**, v. 58, p.2554, 1986.
- [46] HU, W., HARAGUCHI, H. **Analytical Chemistry**, v. 66, p.765, 1994.
- [47] HU, W., MIYAZAKI, A., HARAGUCHI, H. **Analytical Science**, v.11, p. 999, 1995.
- [48] NESTERENKO, P. N., HADDAD, P. R. **Analytical Science**, v.16, p. 999, 2000.
- [49] NESTERENKO, P. N. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p.565, 2001.
- [50] DABEK - ZLOTORZYNSKA, E., DLOUHY, J. F. **Journal of Chromatography**, v. 640 p. 217, 1993.
- [51] SCHÄFER, H., LÄBLI, M., DÖRIG, R. **Ion Chromatography, Theory, Columns and Eluents**, Monografia 50143, Herisau, Metrohm AG, 2003, 54 p.
- [52] STEVENS, T. S., DAVIS, J. C., SMALL, H. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1488, 1981.
- [53] STILLIAN, J. R., POHL, C. A. **Journal of Chromatography A**, v. 499, p. 249, 1990.
- [54] JACKSON, P. E., WEIGERT, C., POHL, C. A., SAINI, C. **Journal of Chromatography A**, v. 884, p. 175, 2000.

- [55] LIU, Y. AVDALOVIC, N., POHL, C. A., MATT R., DHILLON, H., KISER, R. **American Laboratory**, v. 30, n. 22, p. 8, 1998.
- [56] GJERDE, D.T; FRITZ, J.S.; SCHMUCHLER, G.; **Journal of Chromatography A**, v.186, p.509, 1979.
- [57] FRITZ, J. S., DUVAL, D. L., BARRON, R. E., **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 1177, 1984.
- [58] SRBEK, J., **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1263, 2005.
- [59] LINDASY S., **High Performance Liquid Chromatography**, 2nd ed., London: Wiley, 1992. 337 p.
- [60] LEVIN, S., GRUSHKA, E. **Analytical Chemistry**, v. 58, p. 1602, 1986.
- [61] LEVIN, S., GRUSHKA, E. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 2428, 1989.
- [62] ZHONG, G., FORNSTEDT, T., GUIOCHON, G. **Journal of Chromatography A**, v. 734, p. 63, 1996.
- [63] SAJONZ, P., YUN, T., ZHONG, G., FORNSTEDT, T., GUIOCHON, G. **Journal of Chromatography A**, v. 734, p. 75, 1996.
- [64] ABREU, O., LAWRENCE, G.D. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 1749, 2000.
- [65] WOODRUFF, A., POHL, C. A., BORDUNOV, A., AVDALOVIC, N. **Journal of Chromatography A**, v. 997, p. 33, 2003.
- [66] ILLER, R. K. **The Chemistry of Silica**, New York: Wiley, 1979. 639p.
- [67] NAWROCKI, J. **Journal of Chromatography A**, v. 779, p. 29, 1997.
- [68] BIJ, K. E., HORVATH, C., MELANDER, R., NAHUN, A. **Journal of Chromatography A**, v. 203, p. 65, 1981.
- [69] MAJORS, R. E. **LC – GC**, v. 12, p. 508, 1994.
- [70] KINKEL, J. N., UNGER, K. K. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 10, p. 1999, 1987.
- [71] SILVA, C. R. **Novos Agentes Sililantes e Suas Aplicações na Modificação de Sílica Gel**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2002, 109 p.
- [72] FONSECA, M. G., AIROLDI, C. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, p. 1375, 1999.

- [73] AIROLDI, C., GUSHIKEM Y., ESPÍNOLA, J. G. P. **Colloids and Surfaces**, v. 25, p. 317, 1987.
- [74] SOLIMAN, E. M., MAHMOUD, M. E. **Analisis**, v. 25, p. 148, 1997.
- [75] YU, L. W., FLOYD, T.R., WARTWICK R. A. **Journal of Chromatographic Science**, 24 (1986).
- [76] AULER, L.M.L.A, SILVA, C.R. COLLINS, K.E., COLLINS, C.H. **Journal of Chromatography A**, v.1073, p. 147, 2005.
- [77] TUNDO, P., VENTURELLO P., ANGELETTI E. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 6547, 1982.
- [78] GUSHIKEM, Y., MOREIRA, W. C. **Colloids and Surfaces**, v. 25, p. 155, 1987.
- [79] IAMAMOTO, M. S., GUSHIKEM, Y. **Analyst**, v. 114, p. 983, 1989.
- [80] IAMAMOTO, M. S., GUSHIKEM, Y. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 129, p. 162, 1989.
- [81] GUSHIKEM, Y., IAMAMOTO, M. S. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 134, p. 275, 1990.
- [82] FUJIWARA, S. T., ALFAYA, R. V. S, GUSHIKEM Y. **Colloids and Surfaces Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, p. 135, 2001.
- [83] GILMARTIN, C., SMITH, J. R. L. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions**, v. 2, p. 243, 1995.
- [84] LORENCETTI, L.L., GUSHINKEM, Y., OLIVEIRA NETO, G., KUBOTA, L.T., FERNANDES, J.R. **Mikrochimica Acta**, v.117, p.239, 1995.
- [85] LORENCETTI, L.L., GUSHINKEM, Y. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.4, p.88, 1993.
- [86] RIBEIRO, E. S., GUSHIKEM, Y. **Electroanalysis**, v. 11, p. 1280, 1999.
- [87] JAL P. K., PATEL, S. MISHRA, B. K. **Talanta**, v. 62, p. 1005, 2004.
- [88] COLLINSON M. M. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 30, 2002.
- [89] CORTES H. J. **Journal of Chromatography A**, v. 234, p. 517, 1982.
- [90] KISELEVA M. G., NESTERENKO P. N. **Journal of Chromatography A**, v. 920, p. 87, 2001.

- [91] CONNOLLY, D., PAULL, B. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p. 353, 2001.
- [92] ITO, K., ARIYOSHI, Y., SUNAHARA, H. **Journal of Chromatography A**, v. 598, p. 237, 1992.
- [93] ITO, K., ARIYOSHI, Y., TANABIKI, F., SUNAHARA, H. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 273, 1991.
- [94] SUZUKI, Y., QUINA, F. H., BERTHOD, A., WILLIAMS, Jr, R. W., CULHA, M., MOHAMMADZAI, I. U., HINZE, W. L. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1754, 2001.
- [95] QIU, H., JIANG, S., LIU, X. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 265, 2006.
- [96] JACKSON, P.E., POHL, C.A. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 393, 1997.
- [97] JACKSON, L., JOYCE, B. PAPER # 952 apresentado em 1997 Pittisburgh Conference, Atlanta, GA.
- [98] JACKSON, P.E., THOMAS, D.H., DONOVAN, B., POHL, C.A., KISER, R.E. **Journal of Chromatography A**, v.920, p.51, 2001.
- [99] WOODRUFF, A., POHL, C. A., BORDUNOV, A., AVDALOVIC, N. **Journal of Chromatography A**, v. 956, p. 35, 2002.
- [100] HUTCHINSON, J. P., ZAKARIA, P., BOWIE, A. R., MACKA, M., AVDALOVIC, N., HADDAD, P. R. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 407, 2005.
- [101] ZAKARIA, P., HUTCHINSON, J. P., AVDALOVIC, N., LIU, Y., HADDAD, P. R., **Analytical Chemistry**, v. 77, 417, 2005.
- [102] HATSIS, P., LUCY, C.A. **Analyst**, v. 127, p. 451, 2002.
- [103] HATSIS, P., LUCY C.A. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 995, 2003.
- [104] PAULL, B., NESTERENKO, P. N. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n°4, p. 295, 2005.
- [105] SHALLIKER R. A., BROYLES B. S., GUIOCHON, G. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 153, 2000.
- [106] ANAZAWA, T. A., **Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas Tipo C₈ para CLAE**. Tese de Doutorado,

- Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- [107] MOSCARIELHO, J.PURDOM, G., COFFMAN, J., ROOT, T. W., LIGHTFOOT, E. N. **Journal of Chromatography A** v. 908, p. 131, 2001.
- [108] GENTILUCCI, T. J., SIVAKOFF, S.I., COX, G.B., STEARNS, S.D., HUTCHINSON, M.H. **Journal of Chromatography A**, v. 63, p. 461, 1989.
- [109] COLLINS, K. E., FRANCHON, A.C., JARDIM, I.C.S.F., RODOVANOVIC, E., GONÇALVES, M.C. **LC-GC**, v. 18, p. 106, 2000.
- [110] LOPES, N. P. **Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para cromatografia líquida de alta eficiência**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2004. 213 p.
- [111] TONHI, E. **Preparação de Colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Recheadas com Polissiloxanos (C1, C8 e C14) Imobilizados sobre Partículas de Sílica Porosa**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2004, 152p.
- [112] BOTTOLI, C.B.G. **Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2002, 209 p.
- [113] ANAZAWA, T.A., JARDIM, I.C.S.F., **Journal of Liquid Chromatography**, v.17, p. 1265, 1994
- [114] ANAZAWA, T.A., CARRARO, F., COLLINS, K.E., JARDIM, I.C.S.F. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 159, 1995.
- [115] ANAZAWA, T.A., JARDIM, I.C.S.F. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 21, p. 645, 1998.
- [116] JARDIM, I.C.S.F., COLLINS K. E., ANAZAWA, T. A. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 299, 1999.
- [117] COLLINS, K. E., SÁ, A.L.A., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H. **Chromatographia**, v. 53, p. 661, 2001.
- [118] FONSECA, D. A. **Fases Estacionárias Reversas Baseadas em Sílica Titanizada, com Poli (metiloctilsiloxano) Imobilizado por Diferentes Tratamentos**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003.
- [119] SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**, 2nd ed., New York: Wiley, 1997. 705 p.

- [120] KASTNER, G. F., FERREIRA, A. V. **Avaliação da Aplicabilidade da Técnica de Análise por Ativação Neutrônica Semi-Paramétrica**, In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC, Guarujá, SP, CD de trabalhos, 2005.
- [121] MARETTI Jr., F. **Roteiro para Irradiações no Reator TRIGA IPR-R1**. Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Nota Técnica CDTN/LABRE/DEAT-004/80. 1980.
- [122] LIESER, K. H. **Nuclear and Radiochemistry: Fundamentals and Applications**, Weinheim: VCH, 1997. 460p.
- [123] DE CORTE, F. **The k_0 – Standardization Methods: a Move to the Optimization of Neutron Activation Analysis** (Thesis) Faculteit Van de Wetenschappen, Ryksuniversiteit Gent, Netherland. 1987, 464p.
- [124] MENEZES, M. A. B. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 257, p. 627, 2003.
- [125] ENGELHARDT H., ORTH, P. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies** v. 10, p. 1999, 1987.
- [126] COLLINS, K. E., CAMARGO, V. R. de, DIMIRAS, A. B., MENEZES, D.T.C., SILVA, P. A. de, COLLINS, C. H. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 291, p. 353, 2005.
- [127] PERKIN ELMER **User's Manual. Elemental Analysis**, Norwalk: Perkin Elmer, 1996.
- [128] SHIMADZU CORPORATION **Specifications, In. Solvente Delivery Module LC-1040 for Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph**, Service Manual, Kyoto: Shimadzu, 1991. 2p.
- [129] MORITA, T., ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de solvente, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**, São Paulo: E. Blücher, 1972. 627p.
- [130] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Standard methods for the examination of water and wastewater**, Washington: APHA, 1995.
- [131] BERENDSEN G. E., PIKAART, K. A., GALAN L. de, **Journal of Liquid Chromatography**, v. 3, p. 1437, 1980.
- [132] LUMLEY, B., KHONG, T. M., PERRETT, D. **Chromatographia**, v. 60, p. 59, 2004.
- [133] ILER, R. K. **The Chemistry of Silica**, New York: Wiley, 197p.

- [134] SILVERSTEIN, R. M., BASSER, G. C., MORRILL T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 2nd ed., New York: Wiley, 1991.
- [135] PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIS, G. S. **Introduction to Spectroscopy**, 2nd ed., New York: Saunders College Publishing, 1996. 551 p.
- [136] BACHMANN, S., MELO, L.F.C., SILVA, R.B., ANAZAWA, T.A., JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, K.E., COLLINS, C.H., ALBERT, K. **Chemistry and Materials**, v. 13, p. 1874, 2001.
- [137] ALBERT, K, BAYER, E. **Journal of Chromatography A**, v. 544, p. 34, 1991.
- [138] DOLAN, J. W. **LC – GC**, v. 16, n°4, p. 350, 1998.
- [139] MATSUSHITA, S., TADA, Y., NOBUYUKI, B., HOSAKO, K. **Journal of Chromatography A**, v. 259, p. 459, 1983.
- [140] FRITZ, J. S., LI, J. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 231, 1998.
- [141] SHIMADZU CORPORATION. **Shimadzu ion chromatography system: applications data book**. Tokyo: [1995], 84p.
- [142] CHRISTIAN, G. D. **Analytical Chemistry**, 4th ed., New York: Wiley, 1986. 676p.
- [143] GJERDE, D. T, FRITZ, J. S., SCHMUCKLER, G. **Journal of Chromatography A**, v. 187, p. 35, 1980.
- [144] SHIMADZU CORPORATION. **High performance packed column for high performance ion exchange: instruction manual** Tokyo: [2005].
- [145] PAPADOYANNIS, I., SAMANIDOU, V., ZOTOU, A. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 18, p. 1383, 1995.
- [146] RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. **Química Nova**, v. 27, p. 771, 2004.