

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MAYSA GISELLE DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FASE ESTACIONÁRIA COM O MÉTODO
DA COMPLEXAÇÃO METAL-QUITOSANA PARA COLUNAS DE CLC E HPLC**

Maceió- AL

21 de Novembro de 2019

MAYSA GISELLE DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FASE ESTACIONÁRIA COM O MÉTODO
DA COMPLEXAÇÃO METAL-QUITOSANA PARA COLUNAS DE CLC E HPLC**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Instituto de Química e
Biotecnologia da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial para obtenção
do grau de bacharel em Química Tecnológica e
Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Janaína Heberle
Bortoluzzi

Coorientador: Ms. Jailton Alves de Vasconcelos
Júnior

Maceió- AL

21 de Novembro de 2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586d Silva, Maysa Giselle da.
Desenvolvimento de uma nova fase estacionária com o método da complexação metal-quitosana para colunas de CLC e HPLC / Maysa Giselle da Silva. – Maceió, 2020.

78 f. : il.

Orientadora: Janaina Heberle Bortoluzzi.

Coorientador: Jailton Alves de Vasconcelos Júnior .

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica e Industrial) – Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 73-78.

1. Fase estacionária (Cromatografia líquida). 2. Cromatografia líquida. I. Título.

CDU:66.081.3

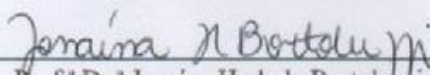
FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYSA GISELLE DA SILVA

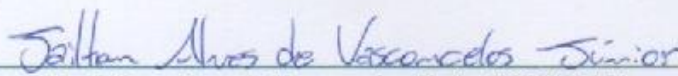
DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA FASE ESTACIONÁRIA COM O MÉTODO DA COMPLEXAÇÃO METAL-QUITOSANA PARA COLUNAS DE CLC E HPLC

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química Tecnológica e Industrial.

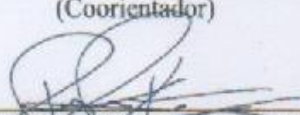
Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Janaina Herbele Bortoluzzi (IQB/UFAL)
(Orientadora)



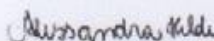
Ms. Jaiton Alves de Vasconcelos Júnior (IQB/UFAL)
(Coorientador)



Prof. Dr. Pedro Pablo Florez Rodriguez (IQB/UFAL)
(Examinador Interno)



Ms. Lucas Natã de Melo (PPGQB/UFAL)
(Examinador Interno)



Dr.ª Alessandra Honjo Ide (CETEC/UFAL)
(Examinadora Externa)

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por iluminar o meu caminho e me abençoar em todo esse ciclo proporcionando a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, Pedro e Maria Pereira, que são meus maiores incentivadores e nunca mediram esforços para que essa etapa fosse concluída, sempre com muito amor, dedicação e compreensão. Sem vocês, eu não teria chegado nem perto de concluir essa etapa. Vocês são minha base e meu orgulho. Sou grata, ao meu irmão, meus tios e avós, que também contribuíram significativamente, com muito apoio e orações.

Ao meu namorado, Lucas Buarque, que me acompanhou desde o início da graduação, me dando apoio e força dia após dia, sendo sempre muito parceiro e paciente. Obrigada por sempre me ouvir nos momentos difíceis.

Ao meu co-orientador, amigo e parceiro de laboratório, Jailton Alves, por sua amizade, empenho a nossa pesquisa e por sempre me motivar. Você foi indispensável para a realização desse trabalho.

Aos grandes amigos da faculdade, Lavínia, Pedro, Laís, Anna Paula, Mariana e Thiago, meu eterno grupo de quigoxtosos, que permitiram que essa caminhada fosse mais leve e alegre. O meu trio, Glenn e Letícia, por estarem presentes e me darem força desde o início do curso.

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa do Grupo de Catálise e Reatividade Química, por todo o apoio, companheirismo e momentos de descontração, especialmente ao Cristian, Débora e Victor.

A minha Orientadora Prof.^a Dr.^a Janaina Heberle Bortoluzzi, pela confiança e apoio durante todo processo de construção desse trabalho, além das excelentes contribuições.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia e todo o seu corpo docente.

A FAPEAL pela bolsa concedida.

RESUMO

A sílica é considerada o principal suporte cromatográfico utilizado em fases estacionárias (FE), porém sua instabilidade frente a valores de pH extremos é a principal limitação relacionada ao seu uso, podendo ocasionar hidrólise ou solubilização da sílica. A solução para este problema tem sido o revestimento da sílica com outros óxidos metálicos. Este trabalho sugere um método de modificação da sílica utilizando uma mistura de óxidos de lítio, bário, zircônio, alumínio, titânio, por meio do método de complexação metal quitosana, com intuito de ser aplicada como FE em cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi desenvolvido um material, denominado Exp 1, com proporção de óxidos de 65% SiO₂, 29% Li₂O, 1% ZrO₂ e 5% BaO. A etapa de calcinação na síntese deste material foi otimizada, variando parâmetros como temperatura, taxa de aquecimento e tempo de permanência, onde foi observado as melhores propriedades de 350 °C, 3°C/min e 3 horas, respectivamente. O material otimizado foi caracterizado por meio da técnica de adsorção/dessorção de N₂ (BET), apresentando área superficial de 220 m²/g. Outra FE, a Exp M, foi desenvolvida com sílica e variando os óxidos utilizados, em relação à anterior, na qual foram utilizados uma mistura de óxidos de lítio, titânio, bário, alumina incorporados a sílica (19% Li₂O, 1% TiO₂, 5% BaO, 35% Al₂O₃ e 40% SiO₂). Esse material apresentou área superficial de 249 m²/g e foi utilizado para análises em CLC, com tamanho de partícula de 45-100 µm, na separação de monoacildlicerídeos (MAG), diacilglicerídeos (DAG) e triacilglicerídeos (TAG) na qual não foi observada separação como era esperado. Essa mesma análise foi feita utilizando sílica comercial, como FE e também não foram observados resultados satisfatórios mostrando a necessidade de otimização do método de separação. Utilizou-se diferentes padrões analíticos para testar a eficiência das FE desenvolvidas, Exp 1 e Exp M, em HPLC. O primeiro material a ser testado foi o Exp 1, no primeiro teste utilizando os compostos polares oriundos da oxidação do álcool benzílico (benzofenona, ácido benzoico, álcool benzílico e benzaldeído) foi observado que houve a coeluição de três dos quatro compostos analisados. Na análise dos compostos menos polares (naftaleno, benzeno, nitrofenol e tolueno) houve a coeluição dos quatro analitos, logo a FE não foi eficiente. Utilizando como FE o Exp M, foram feitas análises com os analitos menos polares, onde houve a coeluição de todos os compostos. Sendo assim, foram utilizados compostos polares oriundos da oxidação do álcool benzílico e foi observado que houve a separação dos compostos mais polares dos menos polares. A eficiência da FE, Exp M, também foi testada na separação de alguns compostos polares ácidos (ácido mercaptobenzóico, ácido cianobenzóico e ácido dimetilaminobenzóico), na qual foi visto que houve separação dos compostos. As FE desenvolvidas foram caracterizadas antes e após utilização da coluna pelas técnicas instrumentais de análise termogravimétrica (TGA), difração de raio X (DRX) e infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), para avaliar a estabilidade do mesmo, onde os materiais não se mostraram totalmente estáveis.

Palavras-chave: Fase estacionária, cromatografia, caracterização, área superficial.

ABSTRACT

Silica is considered the main chromatographic support used in stationary phases (SP), but the instability presented by silica at extreme pH is the main limitation related to its use, which may cause hydrolysis or solubilization of the silica. The solution to this problem has been the coating of the silica with other metal oxides. This work suggests a silica modification method using a mixture of lithium, barium, zirconium, aluminum, titanium oxides through the chitosan metal complexation method, with the goal to be applied as a SP in classical liquid chromatography (CLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). A material was developed, called Exp 1, in oxide ratio of 65% SiO₂, 29% Li₂O, 1% ZrO₂ and 5% BaO. The calcination step in this material synthesis was optimized, varying parameters such as temperature, heating rate and length time, what it was observed the best properties in 350 °C, 3 °C/min and 3 hours, respectively. The optimized material was characterized by N₂ adsorption/desorption technique by BET's method, presenting a surface area of 220 m²/g. Another SP, called Exp M, was developed with silica and varying the oxides used in relation to the previous one, there was used a mixture of lithium, titanium, barium and alumina oxides incorporated into the silica (19% Li₂O, 1% TiO₂, 5% BaO, 35% Al₂O₃ and 40% SiO₂). This material had a surface area of 249 m²/g and it was applied for CLC analysis, with a particle size of 45-100 μm, for separation of monoacylglycerides (MAG), diacylglycerides (DAG) and triacylglycerides (TAG) which separation was not observed as expected. However, the same analysis was performed using commercial silica as stationary phase, and the observed results were not satisfactory, it showed the need for optimization of the separation method. Different analytical standards were used to test the efficiency of the developed SP, Exp 1 and Exp M, on HPLC. The first material tested was Exp 1, in the first test using polar compounds derived from benzyl alcohol oxidation (benzophenone, benzoic acid, benzyl alcohol and benzaldehyde) it was observed that there was coelution of three of the four compounds analyzed. In the analysis of the less polar compounds (naphthalene, benzene, nitrophenol and toluene) the four analytes were coeluted, so the SP was not efficient. Using as SP the Exp M, they were made with the less polar analytes, where there was coelution of the analytes, since the coelution of the less polar compounds, polar compounds from the benzyl alcohol oxidation were used and it was observed that happened the separation of the most polar compounds to the less polar. The efficiency of SP, Exp M, was also tested in the separation of some polar acid compounds (mercaptobenzoic acid, cyanobenzoic acid and dimethylaminobenzoic acid), where the compounds were separated. The developed SP were characterized before and after use of the column by the thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (DRX), and Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR) instrumental techniques, to evaluate its stability, where the materials were not totally stable.

Keywords: Stationary phase, chromatography, characterization, surface area.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos tipos de cromatografia.

Figura 2: Estágios envolvidos na cromatografia líquida clássica.

Figura 3: Componentes do sistema cromatográfico para HPLC.

Figura 4: Representação esquemática dos modos de separação de a) cromatografia de fase normal (FN) e b) cromatografia de fase reversa (FR).

Figura 5: Curvas de TG e DTG.

Figura 6: Representação dos seis diferentes tipos de isotermas de adsorção.

Figura 7: Adaptação da metodologia de síntese de Valentini e col.

Figura 8: Aparato utilizado no empacotamento da coluna cromatográfica.

Figura 9- Termogramas das amostras Exp 1(a) , Exp 2(b), Exp 3(c), Exp 4(d), Exp 5(e), Exp 6 (f), Exp 7(g), Exp 8(h) e Exp 9(i).

Figura 10: Diagrama de Pareto obtido com os resultados de TGA.

Figura 11: Cromatograma das frações obtidas com a FE denominado Exp C.

Figura 12: Cromatograma das frações obtidas com FE sílica.

Figura 13: Cromatograma obtido para os compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico com FE, Exp 1.

Figura 14: Cromatograma obtido para os compostos menos polares (naftaleno, benzeno, tolueno e nitrofenol) com FE, Exp 1.

Figura 15: Cromatograma obtido para fase estacionária, Exp C, com os compostos menos polares.

Figura 16: Cromatograma obtido para fase estacionária, Exp C, com o ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeído e benzil benzoato.

Figura 17: Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando método isocrático com proporção de 95:5 de acetonitrila:água.

Figura 18: Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando método isocrático com proporção de 97:3 de acetonitrila:água.

Figura 19: Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando um gradiente de eluição.

Figura 20: Termograma do Exp 1: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

Figura 21: Espectros do material antes dos testes cromatográficos (Exp 1) e depois dos testes cromatográficos (Exp 1.2).

Figura 22: Difractogramas do material a) antes dos testes cromatográficos (Exp 1); b) após os testes cromatográficos (Exp 1.2).

Figura 23: Termograma do Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

Figura 24: Espectro de infravermelho do Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

Figura 25: Difractograma do material obtido Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos poros conforme seu diâmetro.

Tabela 2: Variáveis do método de calcinação da preparação da fase sólida.

Tabela 3- Proporções dos óxidos estudados.

Tabela 4: Gradiente de eluição para a separação das frações resultantes da CLC.

Tabela 5: Gradiente de eluição para a separação de compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico (ácido benzóico, álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona).

Tabela 6: Gradiente de eluição para a separação dos ácidos (AMB, ACNB e ADAB).

Tabela 7: Dados obtidos através dos termogramas dos nove experimentos.

Tabela 8: Área superficial, volume e diâmetro de poro das amostras calcinadas.

Tabela 9: Comparação entre as áreas superficiais dos Experimentos.

Tabela 10: Tempos de retenção dos compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico e verificação da eficiência da coluna através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). TR = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 11: Tempos de retenção dos compostos menos polares e verificação da eficiência da coluna através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). TR = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 12: Tempos de retenção dos compostos menos polares e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). tR = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 13: Tempos de retenção dos padrões analíticos provenientes da oxidação do álcool benzílico e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). tR = tempo de retenção,

W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 14: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 15: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Tabela 16: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (A_s) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A e B - largura da base do pico até o eixo de simetria.

ACN –Acetonitrila

ACNB –Ácido cianobenzoico

ADAB –Ácido dimetilaminobenzoico

Al₂O₃ – Óxido de Alumínio

AMB –Ácido mercaptobenzoico

As –Assimetria de pico

Ba(CH₃CO₂)₂ – Acetato de bário

BaO – Óxido de bário

BET – Brunnauer, Emmett e teller

CB – Cromatografia por bioafinidade

CCD – Cromatografia em camada delgada

CE – Cromatografia por exclusão

CG – cromatografia gasosa

CGFL – Cromatografia gasosa de fase ligada

CGL – Cromatografia Gás-Líquido

CGS – Cromatografia Gás-sólido

CL- Cromatografia líquida

CLC –Cromatografia líquida clássica

CLFL – Cromatografia líquida com fase ligada

CLL – Cromatografia líquido-líquido

CLS – Cromatografia líquido-sólido

CP – Cromatografia em papel

CSFL – Cromatografia sólida com fase ligada

CSS – Cromatografia supercrítica em fase sólida

CTI – Cromatografia por troca iônica

DAG –Diacilglicerídeo

DRX –Difração de raios x

DTA – Análise térmica diferencial do inglês Differential thermal analysis

DTG – Termogravimetria derivada do inglês Derivated thermogravimetric

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

FN – Fase normal

FR – Fase reversa

FTIR –Infravermelho com Transformada de Fourier derivada do inglês Fourier Transform infrared spectroscopy

H –Altura de pico

HPLC –Cromatografia líquida de alta eficiência derivada do inglês high performance liquid chromatography

IR – Infravermelho

kV –quilovolt

L - Comprimento da coluna

Li₂CO₃ – Carbonato de lítio

Li₂O – Óxido de lítio

mA –Miliampere

MAG –Monoacilglicerídeo

N –Número de pratos teóricos

NH₄OH – Hidróxido de amônio

pH- potencial hidrogeniônico

Rs –Resolução dos picos

SiO₂ – Dióxido de silício

SP- stationary phases

TAG –triacilglicerídeo

TG – Termogravimetria

TGA – Análise termogravimétrica do inglês Thermogravimetric analysis

TiO₂ – Dióxido de Titânio

t_r–Tempo de Retenção

UV –Ultravioleta

Wb–Largura de pico

ZrO₂ – Dióxido de Titânio

ZrOCl₂.8H₂O – Oxicloreto de zircônio octa-hidratado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo principal	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Desenvolvimento histórico	21
3.1.1. Cromatografia Líquida em Coluna.....	22
3.1.1.1. Cromatografia líquida clássica (CLC).....	23
3.1.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	24
3.2. Instrumentação.....	24
3.2.1. Bombas de alta pressão.....	24
3.2.2. Sistema de injeção da amostra.....	25
3.2.3. Colunas	25
3.2.4. Detector	26
3.3. Mecanismos de separação da Cromatografia Líquida	26
3.3.1. Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção.....	26
3.3.2. Cromatografia líquido-líquido ou por partição.....	27
3.3.3. Cromatografia por troca iônica.....	27
3.3.4. Cromatografia por exclusão por tamanho	27
3.4. Cromatografia de fase ligada	27
3.4.1. Cromatografia líquida de fase normal	28
3.4.2. Cromatografia Líquida em Fase Reversa	28
3.5. Tipos de fases estacionárias	29
3.5.1. Sílica	30
3.5.2. Óxidos metálicos e mistos	31
3.6. Métodos de preparação de fase estacionária.....	32
3.7. Técnicas de caracterização.....	33
3.7.1. Análise Termogravimétrica	34
3.7.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	35
3.7.3. Adsorção de N ₂	36
3.7.4. Difração de Raios X (DRX)	38

4. METODOLOGIA	40
4.1. Síntese do óxido misto.....	40
4.2. Otimização da etapa de calcinação da mistura de óxidos	41
4.3. Variação das proporções dos óxidos.....	42
4.4. Separação dos tamanhos de partículas.....	43
4.5. Caracterização dos materiais obtidos.....	43
4.5.1. Análise termogravimétrica (TGA).....	43
4.5.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.5.3. Adsorção de N ₂ (BET).....	44
4.5.4. Difração de raios X (DRX).....	44
4.6. Cromatografia Líquida Clássica (CLC).....	44
4.6.1. Empacotamento da coluna.....	44
4.6.2. Fracionamento de MAG, DAG e TAG	45
4.6.3. Análise das frações por HPLC	45
4.7. Empacotamento da coluna cromatográfica de HPLC.....	46
4.7.1. Testes cromatográficos em HPLC.....	46
4.7.1.1. Testes utilizando coluna recheada com o Exp 1	46
4.7.1.2. Testes utilizando coluna recheada com o Experimento C.....	47
4.7.1.3. Teste de estabilidade dos materiais utilizados.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Otimização da etapa de calcinação da mistura de óxidos	50
5.2. Variação das proporções dos óxidos para obtenção das fases estacionárias	53
5.3. Testes cromatográficos	54
5.3.1. CLC	54
5.3.2. HPLC.....	56
5.3.2.1. Testes utilizando coluna recheada com a fase estacionária Exp 1	56
5.3.2.2. Testes utilizando coluna recheada com a fase estacionária definido como Exp C	59
5.4. Caracterização do material antes e após o uso em cromatografia	66
5.4.1. Caracterização do Experimento 1.....	66
5.4.1.1. Análise Termogravimétrica (TGA).....	66
5.4.1.2. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	67

5.4.1.3.	Difração de raios X (DRX)	68
5.4.2.	Caracterização do Experimento C	68
5.4.2.1.	Análise termogravimétrica (TGA)	68
5.4.2.2.	Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	69
5.4.2.3.	Difração de raios X (DRX).	70
6.	CONCLUSÕES	72
7.	PERSPECTIVAS	73
8.	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia é um método analítico que surgiu em 1906, quando o botânico russo, Tweest, obteve a separação dos componentes de extratos de folhas em bandas com colorações diferentes. Desde aquela época, esta técnica vem crescendo e nos dias de hoje é desenvolvida de forma sofisticada e precisa (MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

Existem diversas técnicas cromatográficas que podem ser classificadas de acordo com vários fatores, como mecanismo de separação, fase móvel empregada e forma física do sistema, podendo ser planar ou em coluna (LANÇAS, 2016).

Um dos sistemas cromatográficos existentes e mais utilizados na década de 70 era a cromatografia líquida clássica (CLC), que se tratava de uma técnica bastante lenta, na qual eram utilizadas colunas recheadas com partículas de tamanho elevado e irregulares. Com intuito de aumentar o desempenho, eficiência, resolução e possibilidade de análises mais rápidas surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (COLLINS et.al., 2006; PACHECO, 2015).

Na cromatografia líquida de alta eficiência é empregada uma bomba de alta pressão e se caracteriza por colunas recheadas com partículas de elevada área superficial. Desde o seu surgimento, esta técnica analítica vem sendo amplamente desenvolvida e utilizada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas, em muitos outros campos da ciência e até em órgãos governamentais (MALDANER; JARDIM, 2009; MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

Neste tipo de cromatografia existem diversos mecanismos de separação que são empregados de acordo com o analito e tipo de análise desejada, são eles: Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção, líquido-líquido ou por partição, por troca iônica, por exclusão de tamanho e de fase ligada. (LANÇAS, 2016)

A fase estacionária utilizada neste método cromatográfico deve suportar as altas pressões as quais são submetidas, sendo assim deve se tratar de um sólido com elevada resistência mecânica, além disso devem ser eficientes e seletivas na separação dos analitos. A maioria das fases estacionárias produzidas são baseadas em sílica, pois se trata de um material com alta

resistência mecânica, ou seja, suporta altas pressões (NAWROCKI et al.,2004; TONHI et al ,2002)

A depender do grupo ligado a superfície da sílica, é possível definir o modo de separação operante. Quando a sílica está ligada a um grupo polar o modo de separação é definido como fase normal, em contrapartida, ao se ter um grupo não polar ligado à superfície da sílica, tem-se fase reversa (DONG, 2006)

A sílica também possui algumas desvantagens, como a instabilidade frente a pH extremos, menor que 2 e maior que 8, além de ser termicamente instável quando submetida à temperatura maior que 60 °C. Com intuito de superar as limitações da sílica, vêm sendo produzidas fases estacionárias compostas por óxidos metálicos e mistos, pois se tratam de materiais que possuem excelentes características, como estabilidade química e térmica. Os mais utilizados são alumina, titânia, zircônia, cério e tório (GORAIEB et al, 2013; NAZARIO et al., 2013).

Nos últimos anos, fases estacionárias mais eficientes, estáveis e que apresente um menor tempo de análise têm sido buscadas e desenvolvidas. Assim, este trabalho visa obter uma fase estacionária, para colunas de CLC e HPLC, composta pela modificação da sílica com outros óxidos como a alumina, óxidos de zircônio, lítio, bário e titânio. As proporções desses óxidos também serão alteradas com intuito de avaliar a estabilidade térmica e a eficiência cromatográfica desse material. Com essas alterações, espera-se que a faixa de aplicação do material como fase estacionária seja ampliada, além de diminuir os tempos de análise.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Produzir novas fases estacionárias utilizando um óxido misto por meio da complexação metal-quitosana, para a utilização em colunas de cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar a etapa de calcinação para aumentar a área superficial do material;
- Testar diferentes proporções de óxidos, também com o intuito de aumentar a área superficial do material;
- Caracterizar os materiais obtidos por meio de diferentes técnicas instrumentais, como: análise termogravimétrica (TGA) , difração de raio X (DRX) , adsorção de N₂ (BET) e espectroscopia de infravermelho (FTIR).
- Aplicar um material selecionado, de 45-100 µm, como FE em CLC para separação de uma amostra contendo monoacildlicerídeos (MAG), diacilglicerídeos (DAG) e triacilglicerídeos (TAG).
- Utilizar os materiais selecionados para a separação de diferentes analitos em HPLC;
- Caracterizar o material após análises de HPLC para avaliar a estabilidade do mesmo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Desenvolvimento histórico

A cromatografia é um método de separação que está fundamentada na migração dos componentes de uma mistura entre duas fases que estão em contato, a fase estacionária, que é fixa, e a fase móvel, que se apresenta como um fluido que se move através da primeira fase (CIOLA, 1998; COLLINS et.al., 2006; LANÇAS, 2016).

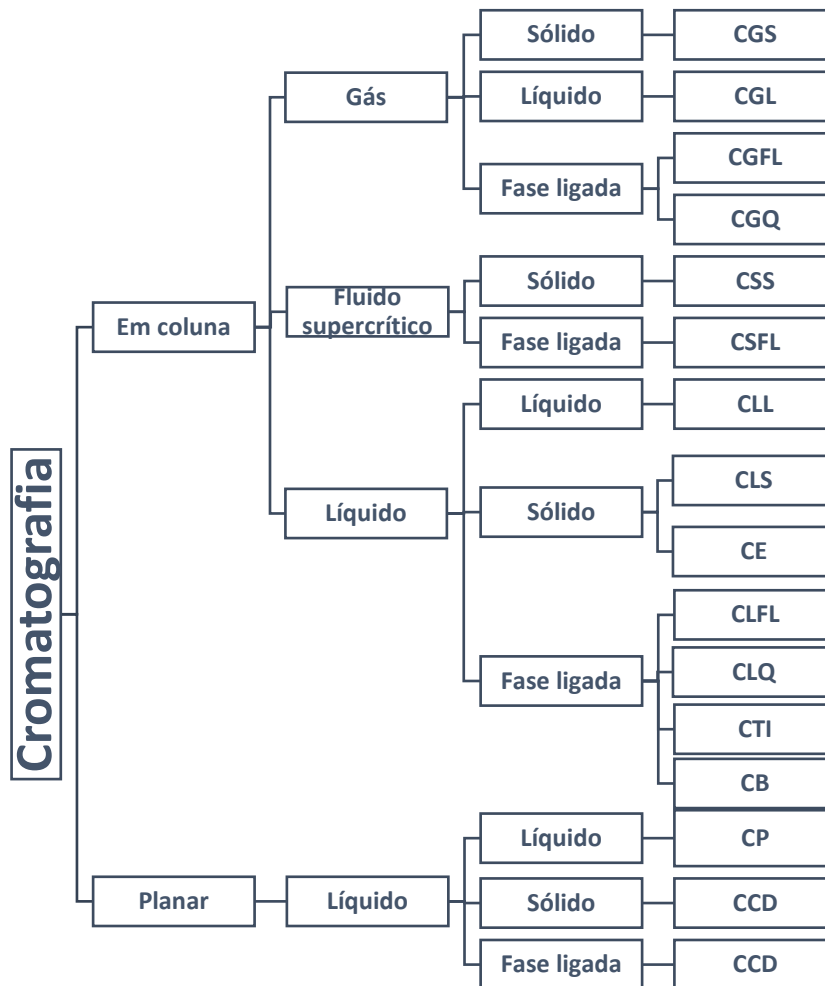
Em 1906, o botânico russo Mikhael Semenovich Tswett utilizou o termo cromatografia em seus dois trabalhos que relatou a separação dos componentes de extratos de folhas. Essa separação ocorreu com a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levando à separação dos componentes em faixas coloridas. O nome da técnica é derivado das palavras gregas *chrom*= cor e *graphie* = escrita. Já naquela época existiam outros trabalhos nesse segmento sendo desenvolvidos paralelamente, porém o primeiro a entender e explicar o processo cromatográfico como abordado nos dias atuais foi Tswett (DEGANI et al.,1998; COLLINS et.al., 2006).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de separação, a técnica empregada ou até mesmo ao tipo de fase móvel utilizada. A cromatografia também pode ser classificada pela forma física do sistema, se a separação ocorre em um tubo cilíndrico é chamada de cromatografia em coluna, enquanto se disposta sobre uma superfície planar é denominada de cromatografia planar (LANÇAS, 2016).

Levando em questão a natureza física da fase móvel a cromatografia divide-se em cromatografia gasosa, que se trata de um gás inerte como fase móvel, cromatografia líquida, quando a fase móvel é um líquido e a cromatografia com fluido supercrítico, na qual um fluido no estado supercrítico é utilizado como fase móvel (COLLINS et.al., 2006).

Na Figura 1 está mostrada a divisão das técnicas cromatográficas, relacionando as fases móveis mais utilizadas.

Figura 1: Classificação dos tipos de cromatografia.



FONTE: Adaptado de COLLINS et.al., 1997.

A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

3.1.1. Cromatografia Líquida em Coluna

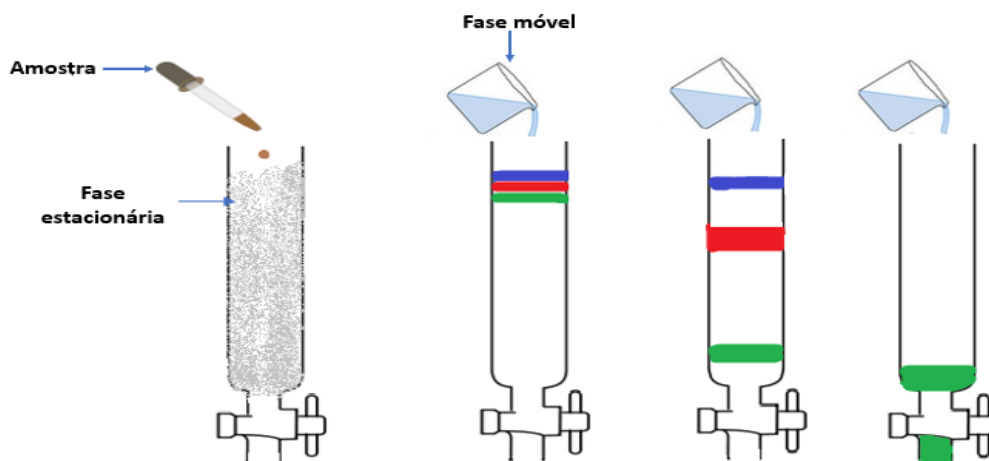
A cromatografia líquida em coluna classifica-se em dois grupos: cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida moderna.

3.1.1.1. Cromatografia líquida clássica (CLC)

Até a década de 70, a cromatografia era realizada em tubos de vidro, sob pressão atmosférica, recheado com fase estacionária, e com o fluxo da fase móvel sob ação da gravidade ou com rápida pressão de um gás inerte. A fase estacionária desse tipo de coluna é, geralmente, utilizada uma única vez, visto que parte da amostra comumente adsorve de maneira irreversível. (CIOLA, R., 1998; COLLINS, C. et.al., 2006)

As separações em LC são lentas e variam, conforme o tamanho da coluna empregada, da granulometria e da natureza da fase estacionária e o tipo de amostra a ser analisada. A detecção e quantificação em CLC, como mostrada na Figura 2, são feitas através de frações coletadas em frascos, que após a evaporação do solvente, também chamado de eluente, são pesados. Por meio da diferença de massa entre o peso do frasco logo depois da evaporação e a do frasco original pode ser construído um gráfico (CIOLA, 1998; LANÇAS, 2016).

Figura 2: Estágios envolvidos na cromatografia líquida clássica.



Fonte: Autora, 2019.

Esse tipo de cromatografia líquida é considerada uma técnica preparativa lenta. É muito usada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas (DEGANI et al, 1998).

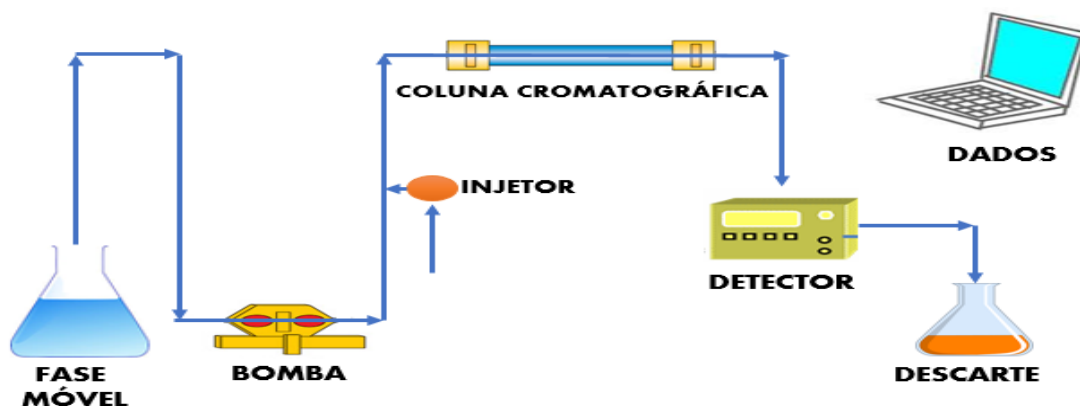
3.1.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

HPLC é considerada uma técnica analítica versátil e de grande aplicação, bastante utilizada em análise de produtos farmacêuticos, biomoléculas, polímeros e muitos compostos orgânicos e iônicos. Essa técnica utiliza colunas de aço preenchidas com um material especialmente obtido, denominado de fase estacionária, e a fase móvel que está sujeita a elevadas pressões. As análises realizadas por meio desta técnica apresentam resultados rápidos, com alta eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade (CIENFUEGOS, F., 2000; DONG, M.W, 2000).

3.2. Instrumentação

Esta técnica faz uso de um conjunto de equipamentos especiais, como ilustrado na Figura 3. Os componentes desse conjunto estão escritos a seguir:

Figura 3: Componentes do sistema cromatográfico para HPLC.



Fonte: Autora, 2019.

3.2.1. Bombas de alta pressão

A bomba possui função de enviar a fase móvel para coluna em um fluxo constante. O sistema é composto pela bomba e por controladores de pressão e de vazão. Esse tipo de bomba é

indispensável para que a fase móvel flua sem que haja grande interferência da pressão que as partículas da fase estacionária exercem por seu tamanho reduzido. O bom exercício das bombas de alta pressão possibilita um tempo curto de análise à vazão constante não interferindo no sistema de detecção (COLLINS et.al., 2006; AQUINO NETO et.al., 2003).

3.2.2. Sistema de injeção da amostra

A injeção da amostra pode ser realizada por dois mecanismos: por meio de válvulas manuais de amostragem ou através de uma seringa de injeção. A amostra deve preencher uma serpentina de volume conhecido, denominado alça de amostragem, o excesso da amostra é descartado em um frasco. Quando a válvula é acionada, a amostra é transferida para a corrente da fase móvel (AQUINO NETO et.al., 2003).

3.2.3. Colunas

As colunas cromatográficas utilizadas são geralmente constituídas por aço inoxidável polido, pois é um material mais resistente à pressão, possuem diâmetro interno uniforme que pode variar de acordo com a coluna utilizada: ≤ 1 mm para colunas capilares, de 2 a 6 mm para colunas recheadas e >10 para as preparativas. Além disso, apresentam comprimentos variados que dependem do tipo de coluna utilizada.

Existem dois tipos de colunas utilizadas em cromatografia líquida moderna: coluna de separação e a coluna de guarda. O primeiro tipo de coluna é indispensável para o sistema cromatográfico, pois é onde ocorre a separação dos analitos presentes na amostra. O êxito desse tipo de coluna depende de diversos fatores como a FE e as condições em que a análise será realizada. O último tipo de coluna é localizada entre o injetor e a coluna de separação e é empregada para proteger a mesma, retendo as impurezas para que não contamine a coluna de separação. Possui comprimento de 2 a 5 cm e o mesmo diâmetro que a coluna análoga (COLLINS et.al., 2006; LANÇAS, 2016; AQUINO NETO et.al., 2003).

3.2.4. Detector

Esse componente avalia a fase móvel conforme elui da coluna, através da detecção relacionada a uma transdução, ou seja, o detector funciona como um transdutor transformando os componentes que chegam no seu interior em sinal elétrico. A diferença é medida entre uma propriedade física do soluto na fase móvel e da fase móvel pura e então um sinal é enviado, assim que o resíduo sai da coluna e entra no detector o sinal é gerado. Existem detectores universais e os seletivos, que são classificados de acordo com sua eficácia em relação aos tipos de amostras trabalhadas. Os detectores universais, geralmente, são os mais utilizados devido a possibilidade de trabalhar com vários tipos de amostras. O detector mais parecido com um detector universal em CLC é o de índice de refração. Em contrapartida os seletivos atuam na detecção de amostras complexas, pois apresentam maior detectibilidade, como os detectores por absorbância no ultravioleta e no visível, detectores por fluorescência, entre outros (COLLINS et.al., 2006; AQUINO NETO et.al., 2003).

3.3. Mecanismos de separação da Cromatografia Líquida

Alguns mecanismos de separação fundamentais desta técnica são: adsorção, partição, troca iônica e exclusão de tamanho, os quais serão descritos a seguir.

3.3.1. Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção

Esse tipo de separação apresenta FE sólida e é baseado nas características do analito, como a sua polaridade e geometria, que são responsáveis pela interação dos analitos com a superfície polar da FE, sendo assim quanto mais polares os analitos maior será a ocupação dos sítios ativos na superfície da FE, ou seja, maior seria a interação. Ao contrário dos compostos apolares, que apresentam pouca interação e não movem a molécula da FM. Portanto, o grau de retenção entre a FM e a FE depende da polaridade da molécula. Outro fator bastante significativo é a área superficial da FE, que deve ser grande, implicando em um grande número de sítios ativos (COLLINS et.al., 2006; LANÇAS, 2016).

3.3.2. Cromatografia líquido-líquido ou por partição

A partição depende das diferentes solubilidades que a amostra apresenta diante da FE e FM, ambos líquidos. Com isso, esse processo apresenta sensibilidade em relação a alterações na massa molecular dos analitos. Os compostos mais solúveis na FE indicam maior interação, em contrapartida os menos solúveis são deslocados para FM em um menor tempo (COLLINS et.al., 2006; LANÇAS, 2016).

3.3.3. Cromatografia por troca iônica

É comumente utilizada para separação de compostos iônicos e compostos muito polares. Essa técnica vem sendo utilizada desde o século XX. Nesse caso, a FE é constituída por resinas trocadoras de íons. As resinas utilizadas são constituídas por materiais que possuem cargas elétricas negativas ou positivas, em excesso, que são neutralizadas por contraíons. Esse mecanismo de separação se dá por meio da troca de íons de sinais iguais entre os analitos e os contraíons da resina (LANÇAS, 2016; AQUINO NETO, et.al., 2003).

3.3.4. Cromatografia por exclusão por tamanho

Por ser um tipo de mecanismo de separação diferente dos demais, pois não envolve interações de forças químicas, é considerado o mais simples processo. Nesse tipo de cromatografia o que será importante é o tamanho das moléculas do analito, por isso é necessário o uso de peneiras ou filtros, ou seja, materiais que possuem porosidade controlada, que funcionam como FE nesse tipo de cromatografia. Os compostos com tamanhos grandes não atravessam os poros da FE e são arrastados rapidamente pela FM, enquanto os compostos menores entram na FE e se movem lentamente chegando por último no detector (COLLINS et.al., 2006; LANÇAS, 2016)

3.4. Cromatografia de fase ligada

A FE desse tipo de cromatografia é obtida através da modificação química da partícula de sílica por meio da adição de grupos funcionais ativos. Os mais utilizados são os grupos amino (NH_2), ciano (CN) e diol. Essas fases possuem retenção menor que a sílica, devido ao rápido

equilíbrio entre a FM e FE. O fato da superfície das fases quimicamente ligadas ser heterogênea auxilia na retenção dos solutos, visto que ainda possui grupos silanóis que ainda não reagiram. Esse tipo de cromatografia pode ser classificado, dependendo da FE utilizada, como cromatografia líquida de fase normal ou de fase reversa (CIENFUEGOS, 2000; LANÇAS, 2016).

3.4.1. Cromatografia líquida de fase normal

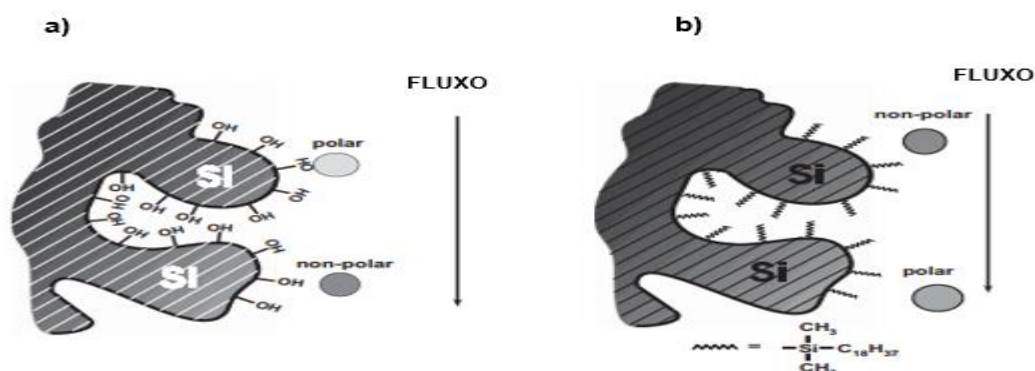
No início da cromatografia quando aplicada como método analítico as fases estacionárias utilizadas eram de maioria polares em contrapartida a fase móvel consistia de solventes menos polares. Nesta situação se operava cromatografia líquido-sólida ou cromatografia de adsorção. Foi determinado que a coluna está operando em fase normal (FN) quando houver a substituição do grupo silanol por um grupo polar, pois a polaridade da fase móvel e da fase estacionária são contrários. A Figura 4.a mostra a partícula de sílica porosa contendo grupos silanol (Si-OH) na superfície e dentro dos seus poros. Devido às intensas interações entre os grupos silanol e os analitos polares, os mesmos se deslocam lentamente através da coluna. A cromatografia líquida de FN é comumente empregada na separação de compostos apolares e isômeros, além do fracionamento de amostras complexas por grupos funcionais ou para limpeza de amostras. A grande possibilidade dos componentes da amostra contaminarem as superfícies polares é considerada uma desvantagem bastante significativa, que pode ser reduzida por meio da ligação de grupos funcionais, como grupos amino ou ciano, aos grupos silanol (DONG, 2006; LANÇAS, 2016).

3.4.2. Cromatografia Líquida em Fase Reversa

Devido à evolução das fases quimicamente ligadas, foi possível a substituição do grupo silanol (Si-OH) da superfície da sílica por grupos polares ou apolares. Nesse caso a ferramenta operante é partição dos analitos entre uma FM polar e uma FE apolar. A Figura 4.b mostra que os analitos polares eluem primeiro ao passo que os analitos apolares interagem mais fortemente com os grupos hidrofóbicos. Quando o grupo silanol é substituído por um grupo apolar, trata-se de um mecanismo contrário à adsorção, abordada no tópico anterior, e, portanto, a coluna está operando em fase reversa (FR). A cromatografia operando com FR é o tipo de análise mais comum,

representando 70% de todas as análises de HPLC. É mais usada na análise de analitos polares (solúveis em água), de polaridade média e alguns não (DONG, 2006; LANÇAS, 2016).

Figura 4: Representação esquemática dos modos de separação de a) cromatografia de fase normal (FN) e b) cromatografia de fase reversa (FR).



Fonte: DONG, 2006

3.5. Tipos de fases estacionárias

Inicialmente, o primeiro mecanismo de separação desenvolvido foi cromatografia líquido-sólido, onde era empregada a adsorção, portanto os primeiros materiais desenvolvidos para serem utilizados como FE foram adsorventes. Na CL clássica os materiais usados como fase estacionária tinha um tamanho de partícula maior ou igual a 40 μm , sendo eles sílica, carvão ativo, alumina e alumina silicato de magnésio. Já na CL moderna tem-se empregado a sílica ou óxido de silício, além de outros materiais que estão sendo estudados nos últimos anos, como por exemplos os óxidos metálicos, sendo os principais o óxido de zircônia e de titânio (LANÇAS, 2016).

Para ser utilizado na produção de FE, um suporte cromatográfico deve apresentar algumas características como: obter um método de síntese das partículas de fácil reprodução; possuir partículas em uma faixa pequena de tamanho e alta área superficial; os poros devem ter um diâmetro apropriado para o tamanho do analito, além de boa conexão, permitindo uma alta taxa de transferência de massa; resistência térmica, mecânica e química à degradação; possuir uma

superfície homogênea, em termos energéticos, e que tenha a possibilidade de apresentar modificação química polimérica (MALDANER et al., 2010).

3.5.1. Sílica

Em 1925, foi publicado um trabalho por Holmes e Anderson, que foi considerado um grande avanço no campo de FE para cromatografia líquida. Esse trabalho apresentou a preparação de géis altamente adsorventes. A sílica-gel, SiO_2 , é o material cromatográfico mais empregado em FE, e isso se deve a algumas características como a elevada área superficial e solidez, sendo capaz de suportar altas pressões da FM, possibilitando separações mais rápidas devido aos fluxos mais elevados, além de poder ser utilizada na preparação de diversas FE (LANÇAS, 2016; MALDANER et al., 2010).

O uso da sílica possui algumas limitações no que diz respeito a estabilidade química e térmica. Em relação a estabilidade química, a faixa de pH das FM utilizadas devem estar entre 2 e 8, isso porque em pH menor que 2 acontece o rompimento da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, ou seja, os grupos siloxanos (Si-O-Si-C) são hidrolisados, resultando na perda de retenção do analito. Em pH básico, maior que 8, a sílica dissolve. Além disso, apresenta limitações quanto à temperatura, não pode ser utilizada com segurança em temperaturas acima de 60 °C, visto que a sílica pode solubilizar, causando colapso do leito cromatográfico e reduzindo o tempo de vida da coluna (LANÇAS, 2016; MALDANER et al., 2010).

Contudo, nos dias de hoje, a produção de vários tipos de sílica tem melhorado a cromatografia. Podemos citar alguns desses tipos, como: sílica moderna, sílica de alta pureza, sílicas híbridas, sílicas superficialmente porosas e sílicas monolíticas.

A sílica moderna refere-se a uma sílica-gel que passou por avanços, e agora são constituídas de partículas esféricas porosas de 10 e de 5 μm . A maior área superficial e a uniformidade da forma resultam em colunas bem preenchidas, aumentando a eficiência e resolução, e podem ser obtidas por variações no processo sol-gel. A sílica cromatográfica contém 0,1 a 0,3% de metais, sendo os mais encontrados Fe, Al, Na, K, Mg, Ca, La, Ti, Zr, Cu, Cr, Zn. Quando as quantidades desses metais são reduzidas a faixas específicas ou quantidades não detectáveis, trata-se de sílica de alta pureza, a presença desses metais na sílica pode levar ao

aumento da acidez dos grupos silanois (Si-OH), de modo que os metais interagem mais com o analito do que a sílica, sendo assim a sílica de alta pureza permite separações mais eficientes e seletivas.

A sílica híbrida é formada por componentes inorgânicos, como a sílica, e orgânicos, como um organossilano, a obtenção desse tipo de sílica se dá por reação de silanização, nesse caso a sílica reage com trietoxissilano (TES) e forma -Si-H em toda sua superfície, apresentando maior estabilidade química.

As sílicas superficialmente porosas são partículas de núcleo fundido que possibilitam uma rápida transferência do analito na camada porosa da FE, além de alta resistência mecânica entre outras vantagens. São geralmente empregadas para a separação de macromoléculas como os peptídeos e as proteínas.

Por último, as sílicas monolíticas são uma estrutura sólida constituída de sílica porosa que permite alta permeabilidade da FM através da FE, acarretando em separações rápidas e alta eficiência da coluna. O processo de obtenção deste tipo de sílica se dá pelo processo sol gel (MALDANER et al., 2010; NAZARIO et al., 2013).

3.5.2. Óxidos metálicos e mistos

Alguns tipos de FE que vêm sendo desenvolvidas são óxidos metálicos e mistos, devido as suas ótimas propriedades, como excelente estabilidade química e térmica, podendo ser empregados em faixas de pH mais amplas. A alumina, titânia e zircônia são os óxidos metálicos mais utilizados, assim como os óxidos de cério e tório, sendo estes últimos de uso mais recente. Uma das características em comum desses materiais que funcionam como suportes cromatográficos é o seu comportamento frente aos diferentes pH da FM, atuando como trocadores iônicos anfóteros, catiônicos ou aniônicos, dependendo do pH da FM. O primeiro suporte cromatográfico constituído por um óxido foi o suporte de alumina. A alumina possui estabilidade química maior que a sílica e resistência mecânica similar, podendo ser utilizada em pH entre 1 e 13, possibilitando a separação de compostos básicos sem o uso de reagente par-iônico. Porém as FE baseadas em sílica possuem eficiência cromatográfica superior a alumina, sendo assim o uso desse suporte é pequeno quando comparados aos outros. A zircônia é o óxido

mais utilizado pois possui maior estabilidade química e térmica em relação aos demais, resiste a faixas de pH entre 1 a 14 e temperaturas até 200°C. A titânia possui propriedades similares às da zircônia, possui estabilidade química maior que a da sílica e se caracteriza por ser um óxido anfótero, ou seja, pode ser utilizado como trocador aniônico em pH ácido e trocador catiônico em pH alcalino (MALDANER et al., 2010; NAWROCKI et al.,2004; TONHI et al.,2002)

Os materiais utilizados como suportes cromatográficos, já citados, possuem algumas desvantagens, como a difícil obtenção desse material que devem cumprir os requisitos para um suporte cromatográfico e funcionalização das partículas em decorrência do baixo número de grupos hidroxilas livres disponíveis em suas superfícies. Além disso, esses materiais inorgânicos devem ter propriedades cromatográficas similares às da sílica. Sendo assim, com intuito de unir as características da sílica e desses materiais, os óxidos mistos têm sido desenvolvidos e utilizados. Óxidos mistos consistem em uma mistura de sílica e de óxido metálico, em que serão combinadas algumas características da sílica como a elevada área superficial e estrutura de poros com a estabilidade térmica e química dos óxidos metálicos. Também são largamente utilizados na área de catálise podendo apresentar propriedades de superfície totalmente diferentes dos componentes iniciais (LANÇAS, 2016; NAWROCKI et al., 2004).

3.6. Métodos de preparação de fase estacionária

Entre as metodologias de síntese de FE polares, as consideradas mais importantes são: o método sol-gel e impregnação com um alcóxido metálico.

O método sol-gel envolve a formação de uma rede polimérica inorgânica por meio de reações de gelificação que ocorrem a temperaturas baixas, é considerado um dos métodos mais utilizados. As reações que ocorrem nesse método ocasionam na transição de um líquido para um sólido, onde, os precursores metálicos reagem com uma solução contendo sílica levando a formação do sol, que consiste de uma dispersão de partículas coloidais estáveis em um fluido. O progresso dessa reação forma o estado gel, no qual os precursores metálicos se ligam aos grupos silanóis da sílica, que apresenta conectividade entre as unidades de dimensões coloidais (BENVENUTTI, 2009; NAZÁRIO, 2013).

O outro método é a impregnação com um alcóxido metálico. Os alcóxidos podem ser entendidos como um composto resultante da reação de um metal com um determinado álcool. Esses compostos são utilizados na preparação de novos materiais, os mais conhecidos são os do alumínio, zircônio e titânio. Nesse método ocorre uma espécie de metalização da sílica, pois o alcóxido metálico forma uma camada do metal utilizado sobre a partícula da sílica, por meio da mistura entre os dois (AIROLDI, 2004; NAZÁRIO, 2013).

Neste trabalho propõe-se desenvolver uma FE composta por sílica e uma mistura de óxidos por meio do método de complexação metal-quitosana. Esse método consiste da mistura dos precursores metálicos utilizados a uma solução de quitosana em meio ácido. Os metais são complexados a quitosana e quando o material for submetido a altas temperaturas ocorre a degradação da quitosana, ocasionado a formação de poros e consequentemente a possibilidade de elevada área superficial do material sintetizado (VALENTINI, 2005).

A quitosana é um dos biopolímeros mais encontrados da natureza e possui propriedades hidrofílicas, atóxicas e biocompatíveis. Esse material também é caracterizado por sua afinidade de interagir com os íons metálicos, por conta do elevado número de grupos ativos em sua estrutura, que atuam como sítios de coordenação. Devido a isso, a quitosana tem sido utilizada na síntese de diversos materiais (BRAGA, 2009; SALGADO, 2015).

Os materiais sintetizados pelo método de complexação metal-quitosana apresentam elevada área superficial e boa resistência mecânica. Essas características são consideradas requisitos para produção de uma FE eficiente, portanto, esse método já utilizado na síntese de catalisadores, pode também ser empregado na produção de FE em CLC e HPLC.

3.7. Técnicas de caracterização

As técnicas instrumentais para caracterização de materiais são usadas com o intuito de compreender as características relacionadas à composição e estrutura de materiais, diretamente ligadas as propriedades químicas e físicas. A caracterização é essencial para se conhecer as propriedades de um material sintetizado.

3.7.1. Análise Termogravimétrica

Refere-se a uma técnica termoanalítica onde é possível acompanhar a massa de uma amostra em um dado período de tempo variando a temperatura. Por meio das curvas de ganho e/ou perda de massa se pode prever algumas propriedades, como estabilidade térmica, e composição do material (HOLLER, 2009 ; IONASHIRO, 2004).

O equipamento que realiza esse tipo de análise é chamado de termobalança, que possibilita a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura. As termobalanças são compostas por alguns elementos como balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador da temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno (EWING, 1972; IONASHIRO, 2004).

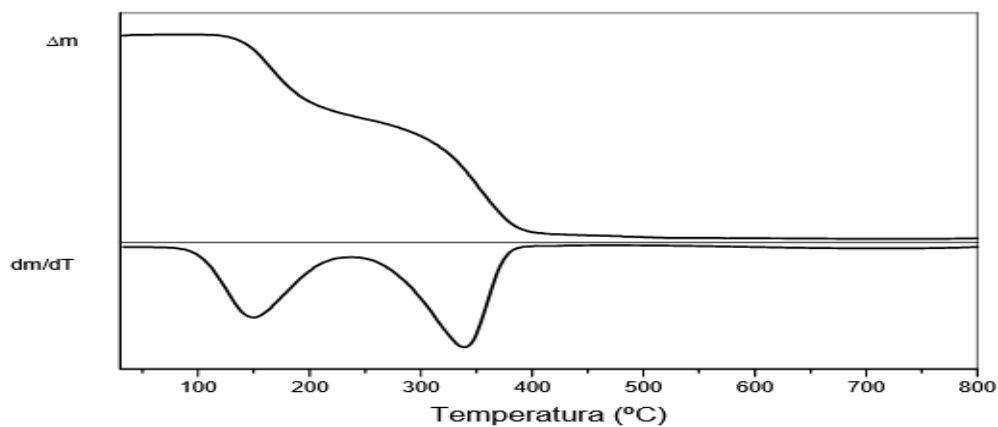
A curva termogravimétrica é uma representação dos resultados desta técnica, onde é possível apresentar a variação da massa em função da temperatura ou tempo. A informação obtida por esta técnica é quantitativa, porém é limitada a alguns processos físicos, como a vaporização, dessorção e sublimação e processos químicos, como as reações de oxidação e decomposição (CIENFUEGOS, 2000; HOLLER, 2009)

Através da primeira derivada da curva TG em função da temperatura ou tempo é obtida a chamada curva termogravimétrica diferencial (DTG) (CIENFUEGOS, 2000)

A DTG pode ser utilizada em situações complexas, identificando exatamente variações de massa em um intervalo pequeno de temperatura e mostrando com exatidão a temperatura relacionada ao tempo onde a velocidade de reação é máxima (IONASHIRO, 2004)

Na Figura 5, pode-se observar que na parte de cima da figura está representado uma curva de TG, onde os degraus indicam a perda de massa em determinado intervalo de temperatura ou tempo, enquanto na parte de baixo da figura é mostrado uma curva de DTG que ao invés de degraus são representados picos que fornecem resultados com maior exatidão (IONASHIRO, 2004).

Figura 5: Curvas de TG e DTG.



Fonte: IONASHIRO, 2004

3.7.2. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A região de radiação infravermelha (IR) se localiza entre as regiões do visível e das microondas, no espectro eletromagnético. A espectroscopia de absorção no IR é uma técnica instrumental utilizada na maioria dos laboratórios, e tem como objetivo determinar os grupos funcionais presentes em uma dada amostra. Cada molécula possui um espectro específico, porém os grupos funcionais presentes absorvem em um comprimento de onda típico de radiação no IR (CIENFUEGOS, 2000).

A região do IR é $4000\text{-}200\text{cm}^{-1}$, entretanto a região mais utilizada pelos químicos é localizada entre 4000 e 666 cm^{-1} , esta área é chamada de infravermelho médio.

O FTIR fornece espectros das moléculas em um intervalo entre 4000 e 400 cm^{-1} . Nas análises de absorção, o caminho ótico produz um interferograma, que é um gráfico de intensidade versus tempo, como é preferível pelos químicos um gráfico de intensidade versus frequência, é realizada uma operação matemática, denominada como transformada de Fourier, onde o interferograma é analisado, separando as frequências das absorções em seus componentes, sendo obtido um espectro com formato intensidade versus frequência. (PAVIA, 2013)

3.7.3. Adsorção de N₂

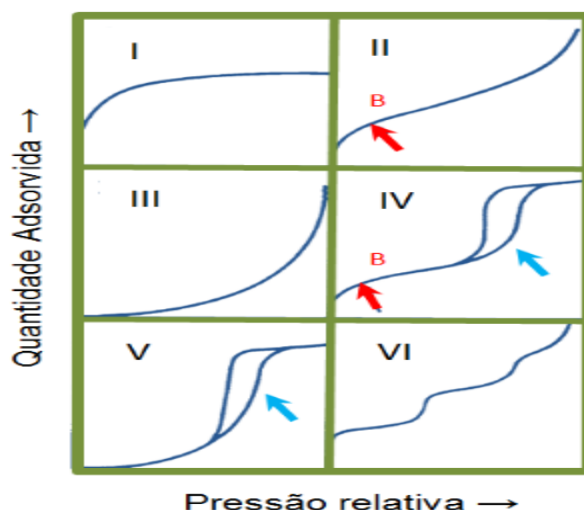
A determinação da área superficial dos materiais sólidos é de grande relevância em diversas áreas de pesquisa, como a cromatografia. Essa área geralmente tem sido obtida através de um método elaborado por Brunauer, Emmette e Teller, denominado como BET (CUSTODIO et al., 2010).

Brunauer, Emmette e Teller fundamentaram sua teoria de adsorção na isoterma de Langmuir, que propõe equilíbrio dinâmico adsorção-dessorção, mas assumindo que uma camada seja capaz de fornecer sítios de adsorção favorecendo a deposição de uma camada sobre a outra (CALPA, L.R.S.,2011).

A análise de BET é executada por meio da adsorção e dessorção de nitrogênio gasoso, ou um gás inerte, sobre a superfície do material. Geralmente, é utilizado o nitrogênio como gás adsorvato em uma temperatura de evaporação de 77K, por proporcionar resultados com maior exatidão, porém quando a amostra a ser analisada possui uma área superficial menor que 5 m²/g é preferível usar outros gases como Criptônio ou Xenônio (CALPA, 2011; GREGG et. al., 1982.).

Existem seis classes de isotermas diferentes, representado na Figura 6, no qual conforme ao tipo de porosidade do material as isotermas apresentam formatos diferentes. (CALPA, L.R.S.,2011).

Figura 6: Representação dos seis diferentes tipos de isotermas de adsorção.



Fonte: CALPA, 2011

As isotermas do tipo I apresentam um mecanismo de adsorção sob baixas pressões e é característico de adsorção em microporos. As isotermas II e III são referentes a sólidos não porosos ou sólidos macroporosos, onde na isoterma II pode-se considerar formação de monocamada, indicada pelo aparecimento do ponto de inflexão. Nas isotermas do tipo III e V as moléculas do adsorvato apresentam fracas interações com o adsorvente. As isotermas IV e V possuem um laço de histerese, representado na Figura X pelas setas azuis, que indicam que as curvas de adsorção e dessorção não coincidem. A isoterma VI apresenta um caso incomum em material normal, e ocorre com a adsorção de um gás por um sólido não poroso de superfície quase uniforme (GREGG et. al., 1982.; ÓRFÃO et. al., 2001; CALPA, 2011).

O ponto B nas isotermas do tipo II e IV mostrado pelas setas vermelhas, indica que o gás adsorvido encerrou a monocamada e iniciou a multicamada, considerada a condensação do adsorvato (CALPA, 2011).

Considerando as isotermas conhecidas, foi determinada uma classificação dos poros de acordo com seu diâmetro, conforme apresentado na Tabela 1 (GREGG et. al., 1982).

Tabela 1: Classificação dos poros conforme seu diâmetro.

Classificação	Diâmetro (Å)
Microporo	$\phi < 20$
Mesoporo	$20 < \phi < 500$
Macroporo	$\phi > 500$

Fonte: GREGG et. al., 1982.

BET desenvolveu um modelo matemático para determinar a isoterma de área superficial que pode ser expressada na sua forma linear específica representada pela equação mostrada abaixo (SING, 2001).

$$\frac{p}{n(p^0 - p)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C - 1}{n_m C} (p/p^0)$$

Onde: p = Pressão; p^0 = Pressão de saturação do gás;
 n = Quantidade de gás adsorvido; n_m = Capacidade de adsorção na monocamada;
 C = Constante relacionada com o tamanho do poro.

3.7.4. Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de Raios X (DRX) é uma técnica de caracterização muito difundida e utilizada, empregada na identificação de componentes e estruturas cristalinas através da difração dos RX, que são gerados ao ser irradiada a amostra (FONSECA FILHO et.al., 2013; CIENFUEGOS, 2000)

Essa técnica apresenta vantagens bem significantes na caracterização das fases presentes em um material, além disso é considerada simples, um método rápido e de grande confiabilidade dos resultados. Através da DRX, é possível analisar amostras compostas por diversas fases cristalinas e ainda quantificá-las. (FONSECA FILHO et.al., 2013)

Nessa técnica de caracterização para a irradiação da amostra é utilizado um feixe monocromático de raios X e com o intuito de identificar a estrutura cristalina da amostra é empregado o feixe difratado. (CIENFUEGOS, 2000)

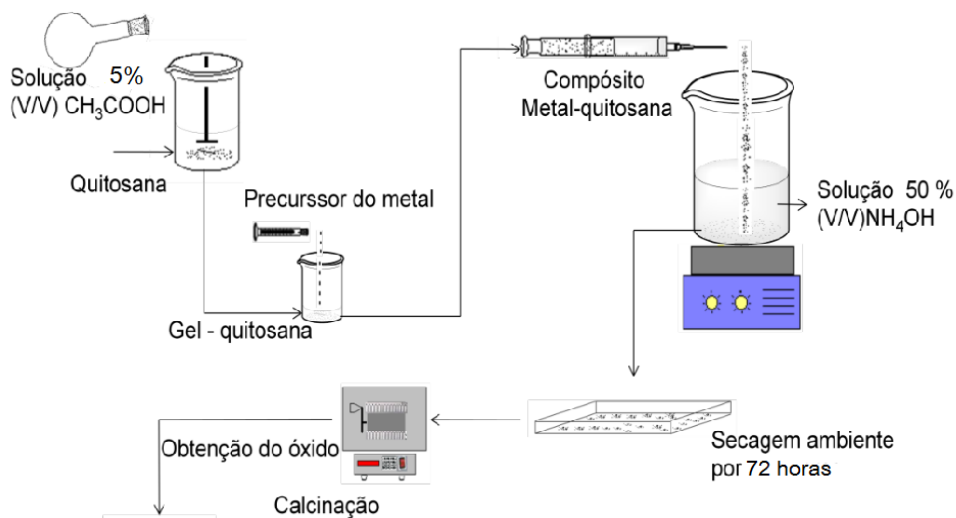
Um espectro típico obtido por DRX é composto por uma série de picos nos quais podem ser caracterizados por meio de suas posições, intensidades entre outros fatores.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese do óxido misto

Os óxidos mistos foram preparados, de acordo com adaptações da metodologia descrita por Valentini e colaboradores (VALENTINI et. al, 2005). A metodologia está ilustrada na Figura 7 abaixo.

Figura 7: Adaptação da metodologia de síntese de Valentini e col.



Fonte: Autora, 2019.

Inicialmente, foram utilizados os seguintes precursores metálicos: SiO₂ (Sigma Aldrich), Li₂CO₃ (Dinâmica P.A.), Ba(CH₃CO₂)₂ (Dinâmica P.A.) e ZrOCl₂.8H₂O (Sigma Aldrich), produzindo uma mistura de óxidos constituída por SiO₂, Li₂O, BaO e ZrO₂ nas seguintes proporções 65%, 29%, 5% e 1%, respectivamente.

Na metodologia utilizada pesou-se a quitosana de baixo peso molecular, 100.000-300.000 g mol⁻¹(Acros Organics), a fim de obter uma proporção quitosana:sais na razão de 1:3. A quitosana pesada foi colocada em um béquer de 250 mL e foi dissolvida com solução de ácido acético 5% (v/v), em seguida a mistura de sais foi dissolvida com um pouco de água destilada e vertida na solução de quitosana, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um mixer (Britânia Ultra Mixer) devido a elevada viscosidade da solução.

A mistura foi gotejada em solução de NH_4OH 50% (V/V), com auxílio de uma seringa, precipitando o complexo formado pelos sais metálicos com a quitosana em pequenas gotículas. Após a precipitação do complexo, o mesmo foi deixado secar na capela por 72 h antes de ser levado a calcinação.

4.2. Otimização da etapa de calcinação da mistura de óxidos

Inicialmente foi otimizada a etapa de calcinação da 1ª proporção de óxidos testada. Neste sentido foram utilizadas as temperaturas de calcinação de, 350, 550 e 750 °C, além de diferentes taxas de aquecimento de 3, 5 e 10 °C min^{-1} e tempos de permanência de 3, 5 e 7 horas. Com o objetivo de diminuir o número de experimentos para avaliar estes três parâmetros na calcinação e ainda avaliar a influência entre eles foi utilizado um planejamento fatorial completo em dois níveis. O planejamento experimental adotado, baseado em dois níveis (x) e três variáveis (y), que são temperatura, taxa de aquecimento e tempo resultou em uma sequência de oito experimentos, ou seja, $x^y \Leftrightarrow 2^3 = 8$. Neste planejamento experimental também foi realizado um PC (ponto central) totalizando 9 experimentos os quais estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Variáveis do método de calcinação da fase sólida.

Amostras	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Taxa (°C min^{-1})
Exp 1	350(-)	3(-)	3(-)
Exp 2	350(-)	3(-)	10(+)
Exp 3	350(-)	7(+)	3(-)
Exp 4	350(-)	7(+)	10(+)
Exp 5	750(+)	3(-)	3(-)
Exp 6	750(+)	3(-)	10(+)
Exp 7	750(+)	7(+)	3(-)
Exp 8	750(+)	7(+)	10(+)
Exp 9 (PC)	550(PC)	5(PC)	5(PC)

Fonte: Autora, 2019.

Os nove experimentos de calcinação realizados de acordo com parâmetros apresentados na Tabela 2 foram nomeados como: Exp 1, Exp 2, Exp 3, Exp 4, Exp 5, Exp 6, Exp 7, Exp 8 e Exp 9 (ponto central).

Após a síntese e calcinação deste material, as 9 amostras obtidas foram caracterizadas por algumas técnicas instrumentais: TGA e BET. Os resultados fornecidos pelas técnicas instrumentais foram utilizados com o intuito de obter parâmetros de resposta para a avaliação deste planejamento experimental no programa Statistica versão 6.0. Por meio da avaliação do planejamento experimental foi escolhida uma amostra com condições de calcinação otimizadas.

4.3. Variação das proporções dos óxidos

Também foram testadas novas proporções de óxidos, como mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Proporções dos óxidos estudados.

Experimentos	Proporções dos óxidos					
	SiO ₂ (%)	LiO ₂ (%)	BaO (%)	ZrO ₂ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	TiO ₂ (%)
1 (Proporção inicial)	65	29	5	1		
A	60	29	5	6		
X	70	24	5	1		
M	40	19	5		35	1

Fonte: Autora, 2019.

No primeiro teste, denominado como Exp A, as proporções dos precursores metálicos SiO₂ (Sigma Aldrich), Li₂CO₃ (Dinâmica P.A.), Ba(CH₃CO₂)₂ (Dinâmica P.A.) e ZrOCl₂.8H₂O (Sigma Aldrich) foram de 60%, 29%, 5% e 6%, respectivamente. No segundo teste, chamado de Exp B, as proporções de SiO₂, Li₂CO₃, Ba(CH₃CO₂)₂ e ZrOCl₂.8H₂O foram de 70%, 24%, 5% e 1%, respectivamente.

No terceiro teste, denominado como Exp C, o agente nucleante foi alterado substituindo zircônia por alumina, além de ser adicionado a alumina com o intuito de tornar a fase mais seletiva e eficiente na separação dos analitos. Para isto foram utilizados os seguintes óxidos nas seguintes proporções: 19% Li₂O, 1% TiO₂, 5% BaO, 35% Al₂O₃ e 40% SiO₂.

Os materiais oriundos dos novos testes foram calcinados, utilizando o método otimizado de calcinação. Após calcinados os materiais foram caracterizados através do BET, para determinar as suas áreas superficiais.

4.4. Separação dos tamanhos de partículas

Os materiais obtidos foram separados em peneiras (Bertel indústria metalúrgica) com diferentes granulometrias, resultando em partículas com tamanho na faixa entre 10-45 µm e 45-100 µm. Após isso, o material foi caracterizado por diferentes técnicas instrumentais como: Análise Termogravimétrica (TGA), Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Adsorção e dessorção de N₂ (BET) e Difração de Raio X (DRX).

4.5. Caracterização dos materiais obtidos

As análises de TGA, FTIR e BET foram realizadas em equipamentos localizados no GCaR (Grupo de Catálise e Reatividade Química). Enquanto, a análise de DRX foi feita no Laboratório de Síntese de Catalisadores (LSCat) sob supervisão do Prof. Dr. Antônio Osimar Souza na UFAL.

4.5.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A primeira técnica instrumental adotada foi o TGA. As análises termogravimétricas foram feitas em um equipamento (TA, Discovery SDT-650) localizado no GCaR. As análises foram feitas em uma faixa de temperatura de 30 a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera inerte de nitrogênio com um fluxo de 50 mL.min⁻¹.

Os resultados obtidos de perdas de massa foram usados como resposta para avaliação do planejamento experimental por meio do diagrama de Pareto.

4.5.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A segunda técnica instrumental usada foi o FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier). Essas análises foram realizadas em equipamento de FTIR (Thermo Fischer, Nicolet IR 200). A medida da transmitância foi realizada na faixa de comprimento de onda de 400-4000 cm^{-1} . As amostras foram maceradas e misturadas com KBr (99,9% de pureza) e então a mistura foi prensada para formar uma pastilha, que foi, então, levada para o equipamento.

4.5.3. Adsorção de N_2 (BET)

Essas análises foram realizadas em um equipamento para análise de área superficial por BET (Quantachrome instruments modelo NOVA 2200e) localizado no GCaR onde foi realizado um tratamento térmico prévio da amostra a 300 $^{\circ}\text{C}$, por um período de 24h, e então seguiu para a análise da área superficial e volume de poro.

Na análise de BET foi obtida a área superficial dos materiais sintetizados e as mesmas foram utilizadas como resposta no planejamento experimental.

4.5.4. Difração de raios X (DRX)

A difração de Raio-X foi realizada em um equipamento (Shimadzu, modelo XRD-6000) localizado no LSCat. Através dessa técnica, foi possível analisar a fase cristalina do material. Foi aplicada a radiação $\text{CuK } \alpha$ com 30 KV de voltagem e corrente de 30 mA, utilizando filtro de Ni utilizando o método de pó. Os difratogramas foram obtidos na faixa de 2θ de 10 $^{\circ}$ a 90 $^{\circ}$ com velocidade do goniômetro de 2 graus por minuto com passo de 0,02 graus.

4.6. Cromatografia Líquida Clássica (CLC)

4.6.1. Empacotamento da coluna

O Exp C, foi utilizado em CLC usando como analito uma amostra contendo monoacildlicerídeos (MAG), diacilglicerídeos (DAG) e triacilglicerídeos (TAG). A coluna foi empacotada com 0,5 g das partículas, de 45-100 μm , suspensas em 1 mL de clorofórmio.

4.6.2. Fracionamento de MAG, DAG e TAG

Para testar a eficiência da FE na separação de MAG, DAG e TAG foi utilizada uma metodologia descrita por Quinlin e colaboradores (QUINLIN et al, 1958). Foi pesado 0,07 g de uma amostra contendo MAG, DAG e TAG dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio (Dinâmica P.A) e então vertido na coluna de vidro previamente empacotada. Em seguida, os analitos foram eluídos utilizando 3 mL de tolueno para eluição dos TAG, posteriormente 3 mL de tolueno:éter etílico (9:1) para eluição dos DAG e por último 3 mL de éter etílico para eluição dos MAG. Para cada uma dessas 3 fases móveis eluídas foram coletadas 3 frações de 1 mL. Após serem coletadas, as frações foram deixadas na capela até que todo o eluente fosse evaporado. Na sequência, foram adicionados 50 µL de metanol e isopropanol:hexano(5:4), fase móvel utilizada no HPLC para identificação dos analitos.

4.6.3. Análise das frações por HPLC

Após esse processo, as frações foram analisadas em um equipamento de HPLC (SHIMADZU) equipado com detector UV-VIS (SPD-20A), bomba quaternária (LC20AT) e coluna C18 (Macherey-Nagel) com dimensões de 250 x 4,6 mm. Usou-se a metodologia descrito por Carvalho e colaboradores, onde foi utilizado um gradiente de FM como mostrado na Tabela 4 e um fluxo de 1 mL min⁻¹. O tempo de análise foi de 23 minutos com temperatura da coluna de 40°C e comprimento de onda do detector de 254 nm (CARVALHO et al, 2012).

Tabela 4: Gradiente de eluição para a separação das frações resultantes da CLC.

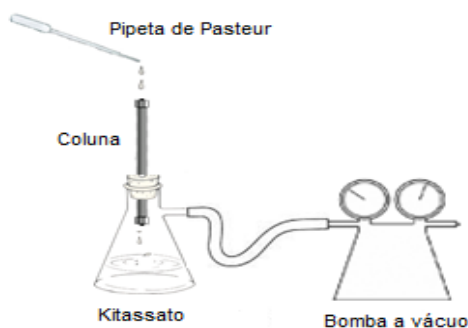
Tempo (min)	% (Metanol)	% Isopropanol:Hexano (5:4)
Início	100	0
10,0	50	50
15,0	50	50
17,0	100	0
23,0	100	0

Fonte: Autora, 2019.

4.7. Empacotamento da coluna cromatográfica de HPLC

As partículas de 45-100 μm obtidas através do Exp 1 e as partículas de 10-45 μm obtidas através do Exp C foram ativadas em estufa (Quimis) a 150°C por um período de 120 minutos para a retirada da água adsorvida. Em seguida foi feito o empacotamento da coluna cromatográfica usando um kitassato com uma bomba de vácuo (Millipore), com o auxílio de um septo para vedar a entrada do kitassato e segurar a coluna como mostrado na Figura 8. O material sintetizado foi misturado a uma solução de hexano (Êxodo Científica, P.A.) formando uma suspensão que foi gotejada na coluna com uma pipeta de Pasteur, tomando cuidado para que o sólido não secasse e rachasse a coluna devido a intercalação de camadas de ar.

Figura 8: Aparato utilizado no empacotamento da coluna cromatográfica.



Fonte: Autora, 2019.

4.7.1. Testes cromatográficos em HPLC

Os testes cromatográficos foram realizados com os matérias denominados: Exp 1 e o Exp C. Para isso foi utilizado um equipamento de HPLC Shimadzu equipado com detector UV-VIS (SPD-20) e bomba quaternária (LC-20AT). A alça de amostragem utilizada foi de 20 μL .

4.7.1.1. Testes utilizando coluna recheada com o Exp 1

A FE denominada de Exp 1, com granulometria em uma faixa entre 45-100 μm , foi colocada em uma coluna de aço de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. Foi testada inicialmente com analitos polares, provenientes da oxidação do álcool benzílico (ácido benzóico,

álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona). Neste teste, foram utilizados como FM acetonitrila grau HPLC (Panreac) e água deionizada obtida do sistema de deionização (Direct-Q Millipore). Usou-se um gradiente de FM iniciando com uma proporção de acetonitrila:água de 55:45, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Gradiente de eluição para a separação de compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico (ácido benzóico, álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona).

Tempo (min)	%A (Acetonitrila)	%B (Água)
Início	55	45
12,0	100	0
15,0	55	45

Fonte: Autora, 2019.

A temperatura da coluna foi de 30 °C e o tempo total de análise foi de 15 minutos. Os padrões analíticos foram preparados a partir de soluções estoques em uma concentração de 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo diluídos para 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para serem analisados.

O segundo teste foi realizado com quatro compostos menos polares (naftaleno, benzeno, tolueno e nitrofenol), e utilizados como FM hexano (Panreac) e acetato de etila (Panreac), ambos grau HPLC, em uma proporção isocrática hexano:acetato de etila de 98:2. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Esses padrões foram preparados a partir de soluções estoques em uma concentração de 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sendo diluídos para 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para os dois testes anteriores foi usado um fluxo de FM de 1 mL min^{-1} e com o detector de UV-VIS no comprimento de onda de 254 nm. Inicialmente injetou-se os analitos separadamente, com o intuito de definir os tempos de retenção dos mesmos.

4.7.1.2. Testes utilizando coluna recheada com o Experimento C

A FE denominada de Exp C, de 10-45 μm , foi testada em uma coluna de aço de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. Os primeiros testes cromatográficos foram feitos com padrões analíticos menos polares (benzeno, tolueno, nitrofenol, e naftaleno) e como FM uma

mistura de hexano (98%) e acetato de etila (2%), ou seja, um método isocrático. O tempo total de análise foi de 20 minutos, o fluxo de FM de 1,0 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna foi de 30°C.

O segundo teste cromatográfico foi feito com analitos polares, provenientes da oxidação do álcool benzílico (ácido benzóico, álcool benzílico, benzaldeído e benzofenona) e metodologia descrita na Tabela 5.

Também foram feitos testes cromatográficos com os seguintes analitos: ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) e foram utilizadas como FM acetonitrila grau HPLC e água deionizada. Na primeira tentativa de separação foi empregado um método isocrático com uma proporção de acetonitrila:água de 95:5. Na segunda tentativa foi usado um método isocrático com uma proporção de acetonitrila:água de 97:3. Por último foi usado um gradiente, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Gradiente de eluição para a separação dos ácidos (AMB, ACNB e ADAB).

Tempo (min)	% Acetonitrila	% Água
Início	97	3
5,0	95	5
17,0	97	3
20,0	97	3

Fonte: Autora, 2019.

Para todos os testes cromatográficos utilizando como analitos os ácidos, a temperatura da coluna foi de 35°C, o fluxo de FM de 1,0 mL min⁻¹ e o tempo total de análise de 20 minutos.

Esses padrões foram preparados a partir de soluções estoques em uma concentração de 10000 µg mL⁻¹ sendo diluídos para 1000 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹. Para os testes cromatográficos foi usado o comprimento de onda de 254 nm.

4.7.1.3. Teste de estabilidade dos materiais utilizados

Após o uso como fase estacionária, em HPLC, a estabilidade dos materiais denominados Exp 1 e Exp C foi avaliada por meio das técnicas de DRX, FTIR e TGA, comparando os resultados de caracterização obtidos antes de ser utilizado.

5. RESULTADOS

5.1. Otimização da etapa de calcinação da mistura de óxidos

A etapa de calcinação deste material foi otimizada utilizando as temperaturas de calcinação de 350, 550 e 750 °C, taxas de aquecimento de 3, 5 e 10 °C min⁻¹ e tempos de permanência de 3, 5 e 7 horas.

Os materiais obtidos nesses 9 experimentos (Tabela 7) foram separados em uma faixa de 45-100 µm e caracterizados por análises termogravimétricas (Figura 9).

A partir dos dados apresentados nas Figuras 9a-i, foi observado que o Exp 7 teve a menor perda de massa (1,44%), o que está relacionado a alta temperatura de calcinação, que degradou praticamente toda a matéria orgânica presente no material, e no Exp 2 ocorreu a maior perda de massa (26,95%) o que prova que quanto menor a temperatura usada na calcinação mais matéria orgânica irá permanecer no material.

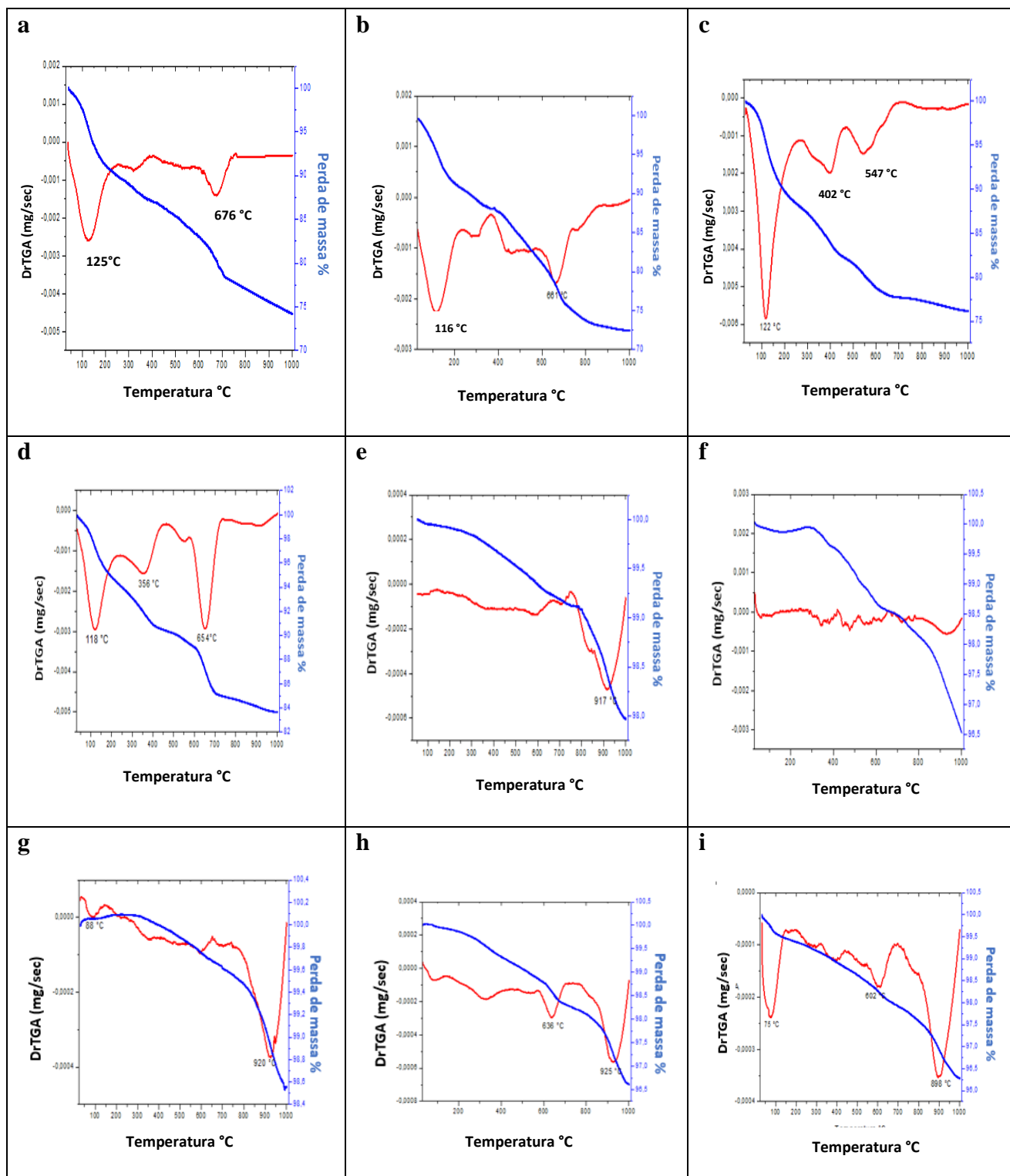
Tabela 7: Dados obtidos através dos termogramas dos nove experimentos.

Amostras	Perda de massa total (%)	Eliminação da água (70-125 °C)	Degradação da matéria orgânica(300-600 °C)
EXP 1	25,74	9,17	16,57
EXP 2	26,95	8,16	18,82
EXP 3	23,69	11,34	12,32
EXP 4	16,21	5,51	10,7
EXP 5	2,02	----*	----*
EXP 6	3,44	----*	----*
EXP 7	1,44	----*	----*
EXP 8	3,38	----*	----*
EXP 9 (PC)	3,63	----*	----*

*dados não significativos

Fonte: Autora, 2019.

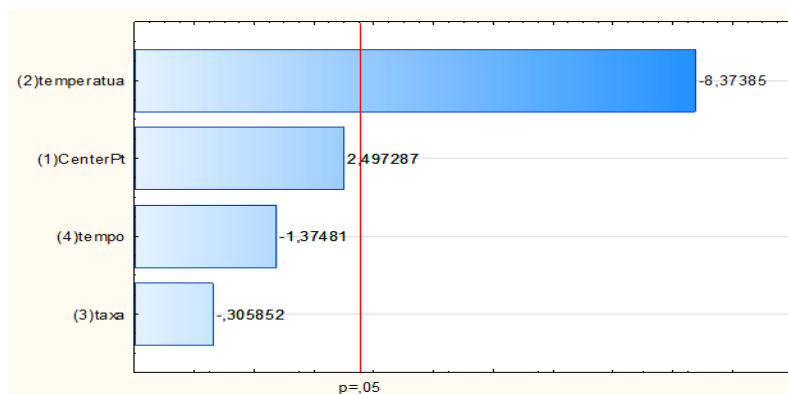
Figura 9: Termogramas das amostras Exp 1(a), Exp 2(b), Exp 3(c), Exp 4(d), Exp 5(e), Exp 6 (f), Exp 7(g), Exp 8(h) e Exp 9(i).



Fonte: Autora, 2019.

As perdas de massa total obtidas nesta análise foram utilizadas como resposta da técnica e com isto foi obtido o diagrama de Pareto (Figura 10). Na Figura 10 foi observado que apenas a variável temperatura se mostrou significativa.

Figura 10: Diagrama de Pareto obtido com os resultados de TGA.



Fonte: Autora, 2019.

Portanto, após a avaliação dos dados experimentais o Exp 1 que foi calcinado com a menor temperatura, 350°C, menor taxa de aquecimento, 3°C.min⁻¹ e menor tempo de permanência, 3 h, foi escolhido para ser utilizado como FE nos testes futuros.

Na sequência os 9 experimentos foram avaliados por BET e os resultados de área superficial, diâmetro e volume de estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Área superficial, volume e diâmetro de poro das amostras calcinadas.

Amostras	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Diâmetro de poro (Å)
EXP 1	220,105	1,1224	147,9766
EXP 2	96,198	1,3066	148,116
EXP 3	30,632	0,068	142,559
EXP 4	24,006	0,158	154,076
EXP 5	14,209	----	----
EXP 6	27,182	----	----
EXP 7	****		
EXP 8	****		
EXP 9 (PC)	****		

****Nessas amostras houve formação de microporos, ou seja, baixo volume específico de poros acarretando baixa área superficial e em virtude disso o equipamento de BET utilizado não foi eficiente.

Fonte: Autora, 2019.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8 foi observado que quanto menor a temperatura de calcinação maior a área superficial e, portanto, maior possibilidade de apresentar boa interação com os analitos.

5.2. Variação das proporções dos óxidos para obtenção das fases estacionárias

Foram avaliadas diferentes proporções de óxidos, conforme descrito na parte experimental, com o intuito de melhorar a estabilidade térmica e a estabilidade frente as faixas extremas de pH, resultando em três novos experimentos, o Exp A, o Exp B e o Exp C cujas as proporções dos seus respectivos óxidos estão contidos na Tabela 3.

Cabe ressaltar, que estes novos materiais, definidos como Exp A, Exp B e Exp C foram calcinados da mesma forma que o Exp 1 (350 °C, 3h e 3 °C min⁻¹).

Os Exp A, B e o C também foram caracterizadas por BET onde foram determinadas as suas áreas superficiais (Tabela 9) e comparadas com o Exp 1.

Tabela 9: Comparação entre as áreas superficiais dos Experimentos.

Amostras	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Diâmetro de poro (Å)
Exp 1	220,105	1,1224	147,9766
Exp A	57,241	0,292	249,89
Exp B	114,074	0,378	95,792
Exp C	248,903	0,692	119,739

Fonte: Autora, 2019.

Na Tabela 9 pode ser visto que as áreas superficiais dos Exp A e B são menores que a do Exp 1 e do Exp C. Sendo assim, esses dois experimentos não foram testados como FE em HPLC visto que, provavelmente, não se obteria êxito na separação cromatográfica, devido a área

superficial menor que a do Exp 1 e do Exp C, o que levaria a uma menor interação da FE com os analitos.

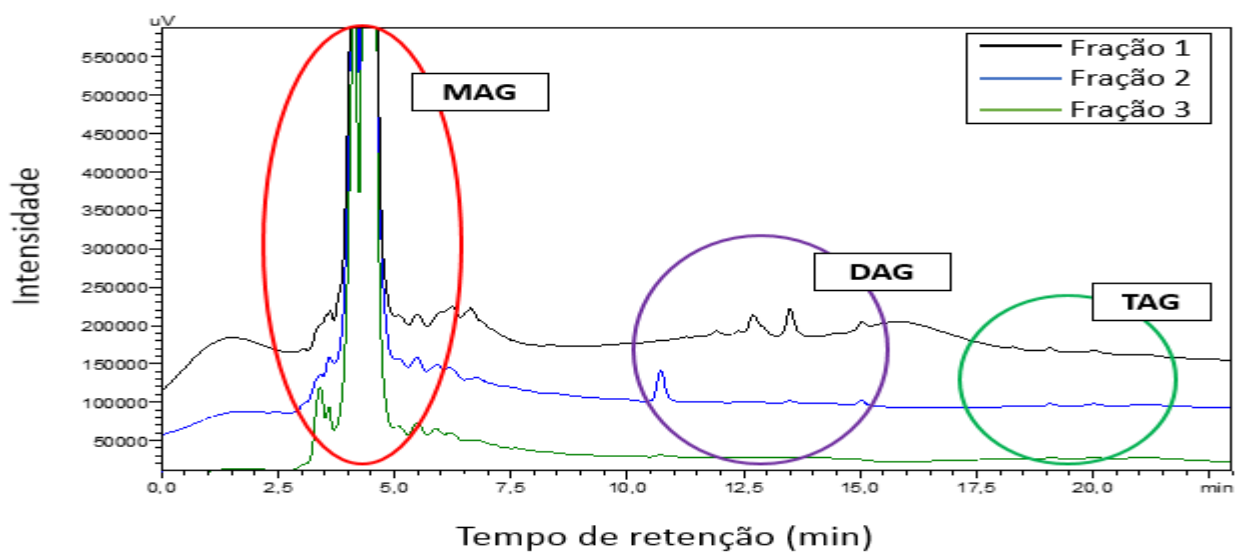
5.3. Testes cromatográficos

O Exp 1 e Exp C, que apresentaram maiores áreas superficiais, foram selecionados para realizar os testes cromatográficos em HPLC. Em colunas de CLC, foi testado o Exp C como FE, devido sua maior área superficial.

5.3.1. CLC

A amostra utilizada para fracionamento em CLC era composta por MAG, DAG e TAG (68,85%, 21,59% e 9,56%, respectivamente). As frações obtidas em CLC, foram analisadas em HPLC de acordo com o método descrito no item 4.5.3 da parte experimental, os cromatogramas estão representados na Figura 11.

Figura 11: Cromatograma das frações obtidas com a FE denominado Exp C.



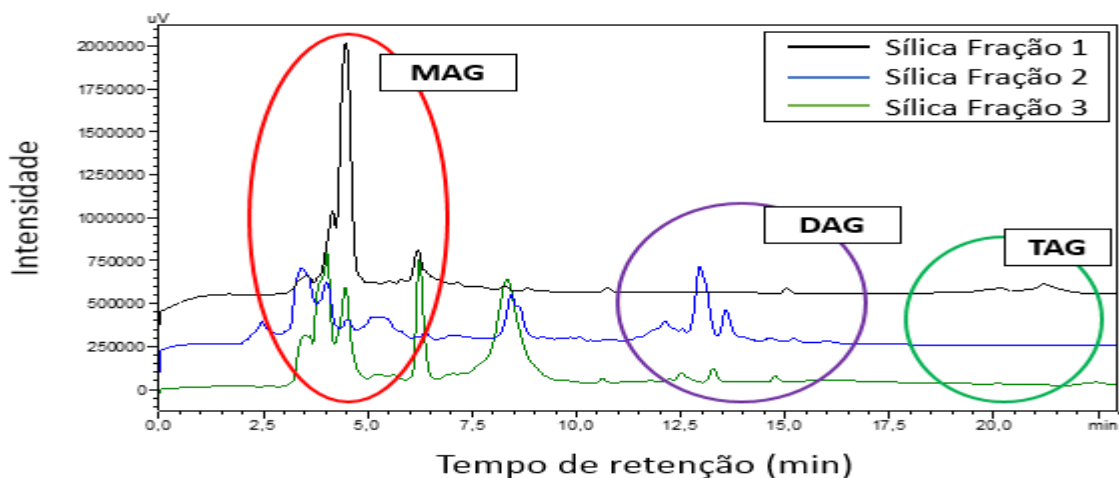
Fonte: Autora, 2019.

As análises das 3 frações por CLC, demonstradas na Figura 11, não foram conforme esperado, ou seja, não foi observada a separação de MAG, DAG e TAG. De acordo com a

metodologia descrita na literatura, esperava-se que na primeira fração, utilizando como FM tolueno, fossem eluídos apenas os TAG. Com posterior eluição dos DAG na segunda fração e, por fim, os MAG, na terceira fração. Nos cromatogramas apresentados na Figura 11 foi observado que os MAG eluíram nas 3 frações o que não era esperado, como pode ser observado através dos picos intensos entre 3 e 5 minutos. Porém, a amostra utilizada apresenta maior concentração de MAG (68,85%) o que pode ter ocasionado a saturação dos sítios ativos da FE, dificultando uma maior interação entre a FE e os DAG e TAG. Na análise da primeira fração é observado uma maior eluição de DAG (picos entre 12 e 15 min) em comparação as demais frações, já na segunda fração nota-se uma maior eluição de TAG (picos entre 16 e 18 min) em relação ao DAG da mesma amostra, enquanto na terceira fração foi notada apenas a presença de MAG como esperado.

Com intuito de avaliar se o material realmente não foi eficiente também foi realizado o fracionamento de CLC com sílica, como descrito na literatura (QUINLIN, P et.al). Como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na Figura 12 também não houve separação de MAG, DAG e TAG. Esse fato indica que a FE desenvolvida no projeto não obteve um desempenho ruim, mas sim que o método descrito na literatura não se mostrou efetivo e necessita de otimização.

Figura 12: Cromatograma das frações obtidas com FE sílica.



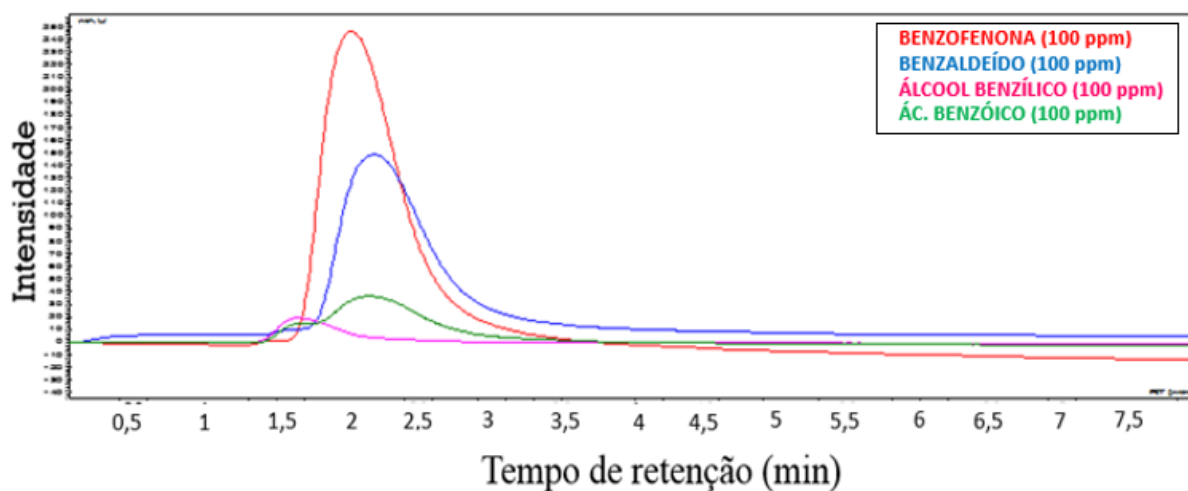
Fonte: Autora, 2019.

5.3.2. HPLC

5.3.2.1. Testes utilizando coluna recheada com a fase estacionária Exp 1

O primeiro teste cromatográfico feito com analitos polares, provenientes da oxidação do álcool benzílico (álcool benzílico, ácido benzoico, benzofenona e benzaldeído), estão representados na Figura 13. Através da análise dos cromatogramas obtidos (Figura 13) foi observado que três dos padrões analíticos, ácido benzoico, benzaldeído e benzofenona, estão coeluinto, ou seja, apresentaram tempo de retenção próximo (Tabela 10).

Figura 13- Cromatograma obtido para os compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico com FE, Exp 1.



Fonte: Autora, 2019.

A eficiência da coluna foi então avaliada através do cálculo dos parâmetros mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Tempos de retenção dos compostos provenientes da oxidação do álcool benzílico e verificação da eficiência da coluna através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N= 16(tR / Wb)^2$	Altura de prato teórico $H= L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$
Álcool benzílico	1,65	84,02	0,18	3,02
Ácido benzóico	2,15	56,91	0,26	1,33
Benzofenona	2,02	75,48	0,20	2,30
Benzaldeído	2,18	77,58	0,19	2,21

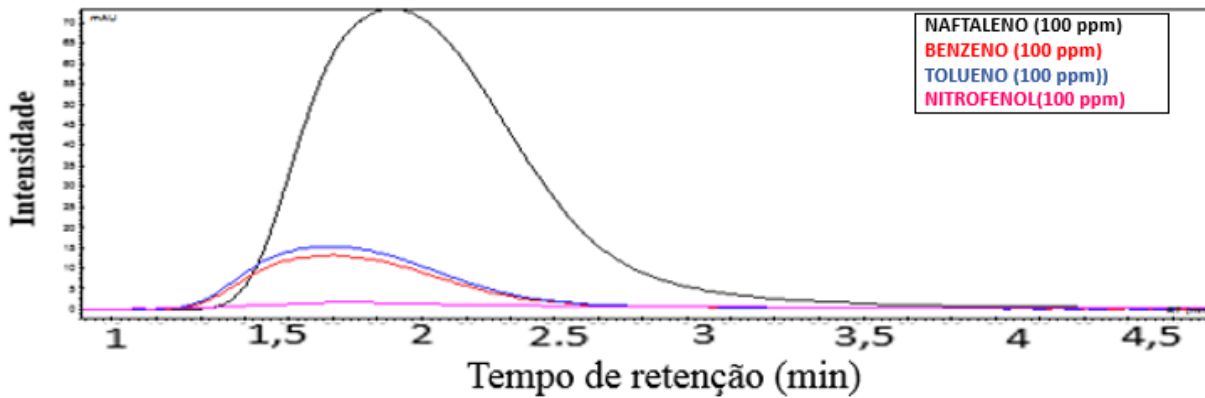
Fonte: Autora, 2019.

O número de pratos teóricos de uma análise pode chegar em média até 30000 sendo assim o N, eficiência desta fase estacionária, para a análise dos quatro analitos foi considerado muito baixo, pois os picos se apresentaram muito largos. Considerando a altura do prato teórico (H), sabe-se que quando esse valor é abaixo de 0,06 é considerado excelente, bom entre 0,06 e 0,10 e aceitável entre 0,10 e 0,15, analisando a H dos analitos podemos perceber que os quatro analitos excederam esses valores apresentados, em virtude do baixo N, ou seja, eficiência.

A assimetria de pico com valores 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios, esse fator está diretamente relacionado a formação de caudas e alargamento dos picos. Observando os valores de assimetria de pico obtidos na Tabela 9, todos os analitos apresentaram assimetria de pico acima dos valores desejados, ou seja, picos largos. (SILVA, 2011)

Na sequência foi testada a eficiência da coluna com quatro compostos menos polares (naftaleno, benzeno, tolueno e nitrofenol), com intuito de melhorar a eficiência da FE e, portanto avaliar se os mesmos separariam ou se haveria coeluição. Após as análises individuais dos padrões analíticos (Figura 14) foi constatada coeluição dos compostos indicando que não houve separação, ou seja, não houve interação suficiente entre os analitos e a fase estacionária.

Figura 14- Cromatograma obtido para os compostos menos polares (naftaleno, benzeno, tolueno e nitrofenol) com a FE, Exp 1.



Fonte: Autora, 2019.

Analisando a eficiência da coluna através do cálculo dos parâmetros apresentados na Tabela 11, podemos observar que o número de pratos teóricos ainda é um número muito baixo. Com relação a altura de prato teórico, todos os analitos, exceto o nitrofenol, apresentaram valores dentro da faixa aceitável. Além disso, todos os analitos apresentaram valores insatisfatórios de assimetria do pico.

Tabela 11: Tempos de retenção dos compostos menos polares e verificação da eficiência da coluna através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). TR= tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

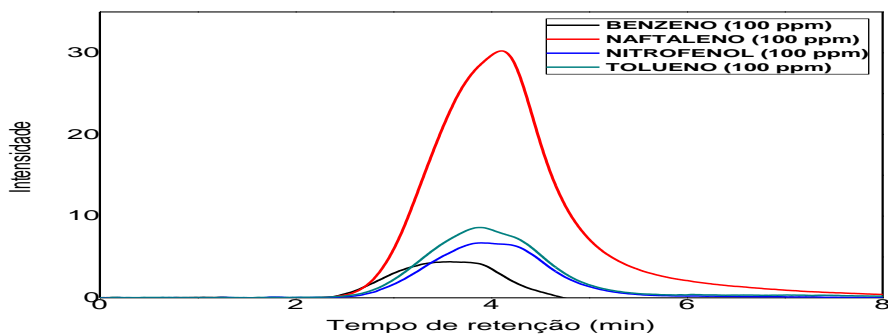
Compostos Orgânicos	Tempo de retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$
Benzeno	2,19	132,85	0,11	2,30
Tolueno	2,19	129,42	0,11	3,00
Nitrofenol	2,21	73,66	0,20	2,10
Naftaleno	2,33	126,09	0,12	2,65

Fonte: Autora, 2019.

5.3.2.2. Testes utilizando coluna recheada com a fase estacionária definido como Exp C

A coluna de HPLC de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro foi empacotada com as partículas de 10-45 μm do Exp C e foram analisados analitos menos polares, (naftaleno, benzeno, tolueno e nitrofenol), com intuito de avaliar se haveria a separação dos mesmos, ou seja, interação com a fase estacionária. Após as análises individuais dos padrões analíticos (Figura 15) foi constatado que os compostos possuem tempos de retenção muito próximos, ou seja, coeluem. Os tempos de retenção indicam que não houve interação suficiente entre os analitos e a fase estacionária, sendo necessários mais testes cromatográficos.

Figura 15- Cromatograma obtido para a fase estacionária, Exp C, com os compostos menos polares.



Fonte: Autora, 2019.

A eficiência da fase estacionária foi avaliada através do cálculo dos parâmetros mostrados na Tabela 12, obtidos através da análise cromatográfica otimizada.

Tabela 12: Tempos de retenção dos compostos menos polares e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, Wb= largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / Wb)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$
Benzeno	3,58	130,58	0,11	0,10
Tolueno	3,88	50,85	0,29	1,21
Nitrofenol	3,89	51,81	0,29	1,24
Naftaleno	4,1	59,81	0,25	1,14

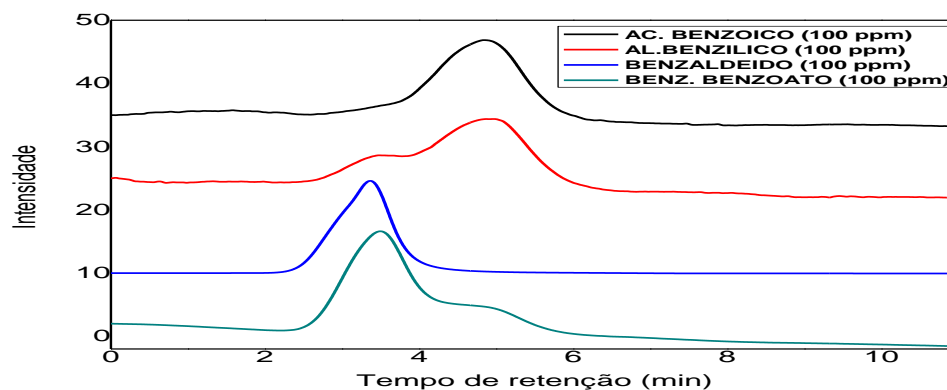
Fonte: Autora, 2019.

Analisando os valores do número de pratos teóricos, assimetria de pico e altura do prato teórico, pode-se dizer que a coluna não foi eficiente, pois apresentou um baixo número de pratos teóricos e a altura de prato teórico, cujo valor excelente é abaixo de 0,06, bom entre 0,06 e 0,10 e aceitável entre 0,10 e 0,15 foi excedida por três dos quatro compostos. Com relação à assimetria de pico, os valores dentro do aceitável são na faixa de 0,8 a 1,2, três dos quatro estão próximos ou dentro da faixa aceitável.

Comparando os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12, com o intuito de analisar a eficiência cromatográfica das colunas empacotadas com o Exp 1 e Exp C, pode-se perceber que a FE Exp 1 possuiu melhor desempenho, pois apresentou maiores números de pratos teóricos além de valores de altura de pratos teóricos dentro do aceitável.

O teste cromatográfico feito com analitos polares, provenientes da oxidação do álcool benzílico os quais estão mostrados na Figura 16. Através da análise dos cromatogramas obtidos foi observado que os compostos mais polares (ácido benzoico e álcool benzílico) apresentaram um maior tempo de retenção, em relação aos menos polares (benzil benzoato e benzaldeído), isso se deve pelo fato da FE ser mais polar, interagindo mais com os compostos mais polares ocasionando maior retenção dos mesmos. Entretanto, o tempo de retenção dos mais polares foram muito próximos entre si, assim como os menos polares.

Figura 16- Cromatograma obtido para fase estacionária, Exp C, com o ácido benzoico, álcool benzílico, benzaldeído e benzil benzoato.



Fonte: Autora, 2019.

Através da análise dos valores do número de pratos teóricos, assimetria de pico e altura do prato teórico (Tabela 13), pode-se dizer que a coluna não foi eficiente, pois apresentou um baixo número de pratos teóricos e em relação à altura de prato teórico, apenas o benzaldeído está dentro da faixa aceitável. Avaliando à assimetria de pico, apenas o benzaldeído está na faixa de 0,8 a 1,2, ou seja, dentro do aceitável.

Tabela 13: Tempos de retenção dos padrões analíticos provenientes da oxidação do álcool benzílico e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $As = B / A$
Benzil Benzoato	3,37	92,64	0,16	0,75
Benzaldeído	3,5	99,95	0,15	0,81
Ácido benzóico	4,85	85,95	0,17	0,58
Álcool benzílico	4,98	91,60	0,16	0,76

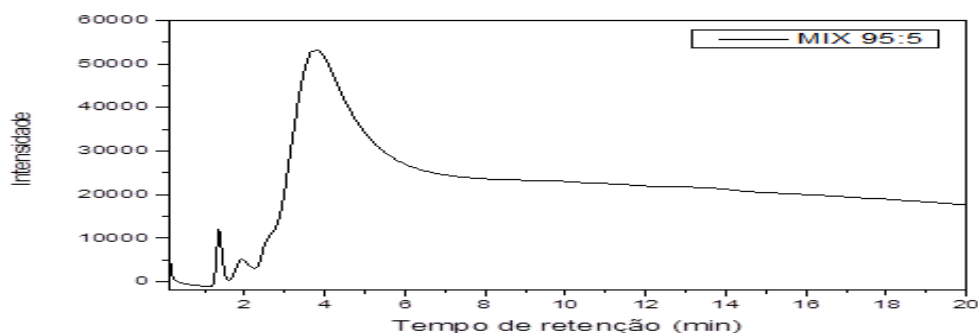
Fonte: Autora, 2019.

Comparando a eficiência do Exp 1 e do Exp C, podemos observar nas Tabelas 10 e 13, que o número dos pratos teóricos dos analitos analisados na coluna empacotada com o Exp C foram maiores, e os valores de altura de prato teóricos foram mais próximos do aceitável além disso apresentaram picos mais simétricos. Portanto, o Exp C apresentou maior eficiência cromatográfica, na análise dos compostos mais polares, que o Exp 1.

Como foi observado que a FE apresentou maior interação com os compostos mais polares, como o ácido benzóico, portanto foram escolhidos compostos derivados deste ácido para os próximos testes cromatográficos. Dessa forma os últimos testes cromatográficos foram feitos com ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB). Na primeira análise desses ácidos foi utilizado um método isocrático com proporção de 95:5 de acetonitrila:água, o cromatograma obtido está mostrado na Figura 17.

A partir da análise dos cromatogramas obtidos (Figura 17) e dos resultados apresentados na Tabela 14, foi possível observar que os tempos de retenção para os compostos testados foram diferentes, entretanto pode-se perceber que os picos se apresentaram muito largos, principalmente o pico referente ao ADAB. A resolução entre os picos apresentada mostrou-se adequado para análise qualitativa ($R_s > 1$), porém ainda abaixo de 1,5, o que é necessário para fins qualitativos.

Figura 17- Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando método isocrático com proporção de 95:5 de acetonitrila:água.



Fonte: Autora, 2019.

Avaliando a eficiência da coluna através dos parâmetros apresentados na Tabela 14, pode-se observar que o número de pratos teóricos do AMB e do ACNB foram bem significativos porém ainda inferior quando comparado as colunas comerciais, com $R_s > 1,50$. A altura de prato teórico do AMB e ACNB ficaram na faixa de 0,06 e 0,10, que indica valores bons, enquanto o ADAB se apresentou fora da faixa aceitável. A respeito da assimetria de pico, apenas o ACNB possui valor dentro da faixa aceitável, de 0,8 a 1,2, enquanto os outros dois analitos excederam essa faixa.

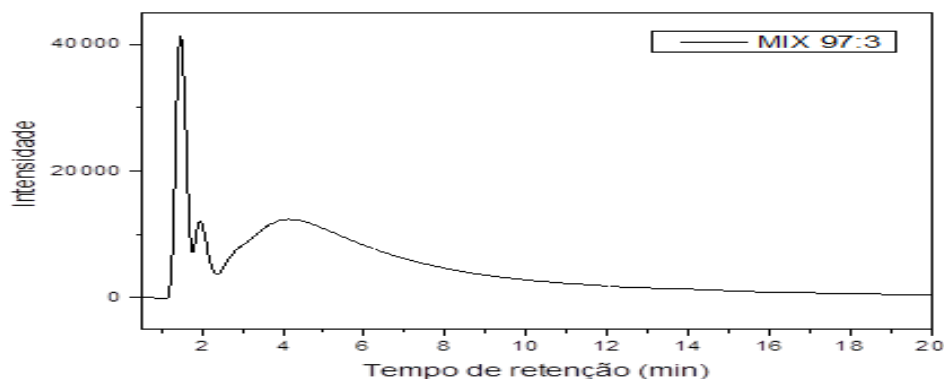
Tabela 14: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$	Resolução
AMB	1,35	480	0,03	1,23	---
ACNB	1,93	243	0,06	1,08	1,36
ADAB	3,78	29	0,52	1,62	1,11

Fonte: Autora, 2019.

Com intuito de aumentar as interações adsorptivas da FE com os analitos, a proporção de água, responsável pela força do solvente, foi diminuída de 5% para 3%, visando aumentar o tempo de retenção e melhorar a resolução entre os picos. Sendo assim, nesta análise da mistura desses ácidos foi utilizado um método isocrático com proporção de 97:3 de acetonitrila:água, e o cromatograma obtido está mostrado na Figura 18.

Figura 18- Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando método isocrático com proporção de 97:3 de acetonitrila:água.



Fonte: Autora, 2019.

Observando os parâmetros na Tabela 15, foi possível avaliar a eficiência da coluna. O ADAB apresentou número de pratos teóricos extremamente baixo, em virtude da largura acentuada do pico. Em relação à altura de prato teórico, o AMB apresentou valor considerado excelente e o valor do ACNB está dentro da faixa aceitável, enquanto o ADAB apresentou valor fora da faixa.

Tabela 15: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L= comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

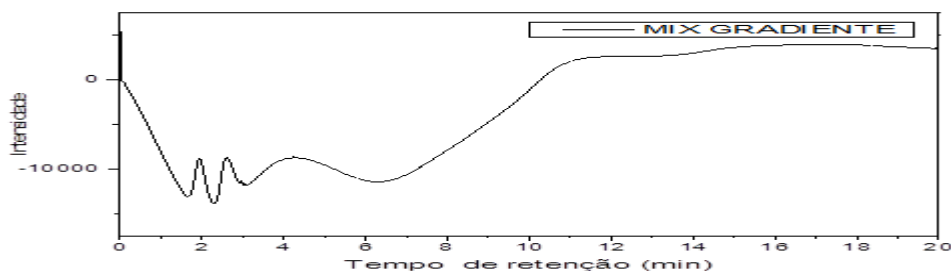
Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $As = B / A$	Resolução
ACNB	1,45	167	0,09	0,45	---
AMB	1,96	374	0,04	0,40	1,14
ADAB	4,13	13	1,15	4,66	0,70

Fonte: Autora, 2019.

Relacionando os cromatogramas mostrados nas Figuras 17 e 18, pode-se observar que os picos referentes aos analitos na análise feita com proporção de 97:3 de acetonitrila:água se apresentaram mais definidos, porém a resolução obtida (Tabela 15) foi menor que a da análise feita com menor proporção de água (Tabela 14).

Nas duas análises anteriores o pico referente ao ADAB se mostrou muito largo, com intuito de reduzir a largura deste pico e melhorar a resolução a mistura desses três padrões analíticos foi analisada empregando um gradiente de eluição, mostrado anteriormente na Tabela 4. O cromatograma oriundo desta análise está mostrado na Figura 19.

Figura 19- Cromatograma obtido para uma mistura contendo o ácido mercaptobenzóico (AMB), ácido cianobenzóico (ACNB) e ácido dimetilaminobenzóico (ADAB) utilizando um gradiente de eluição.



Fonte: Autora, 2019.

Analisando a eficiência da coluna através da Tabela 16 observamos que o número de pratos teóricos ainda é baixo comparado aos das colunas comerciais, entretanto em relação as outras duas análises o ADAB apresentou um maior número de pratos teóricos. Considerando a altura do prato teórico, o AMB e o ACNB apresentaram valores considerados excelentes, enquanto o ADAB excedeu o valor permitido, isso se deve ao baixo número de pratos teóricos. Apenas, o AMB apresentou assimetria de pico satisfatória.

Tabela 16: Tempos de retenção dos padrões analíticos e verificação da eficiência da fase estacionária através dos parâmetros: número de pratos teóricos (N), assimetria de pico (As) e altura do prato teórico (H). t_R = tempo de retenção, W_b = largura da base, L = comprimento da coluna, A e B = largura da base do pico até o eixo de simetria.

Compostos Orgânicos	Tempo de Retenção (min)	Número de pratos teóricos $N = 16(t_R / W_b)^2$	Altura de prato teórico $H = L / N$	Assimetria do pico $A_s = B / A$	Resolução
AMB	1,94	303	0,05	1,18	---
ACNB	2,61	358	0,04	1,36	1,31
ADAB	4,24	36	0,4	1,30	0,91

Fonte: Autora, 2019.

Fazendo uma análise do resultado dos três testes feitos com a mistura de ácidos, observamos que no primeiro teste foi obtido melhor resolução que os demais, entretanto o segundo teste apresentou picos mais definidos e valores excelentes de altura de prato teórico, e no último teste o pico referente ao ADAB se mostrou com menor largura e um valor de assimetria de pico próximo ao aceitável.

5.4. Caracterização do material antes e após o uso em cromatografia

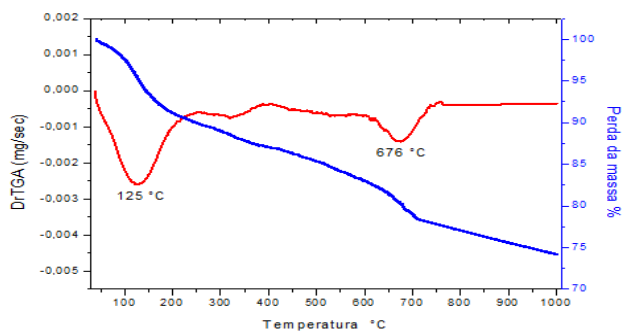
5.4.1. Caracterização do Experimento 1

5.4.1.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

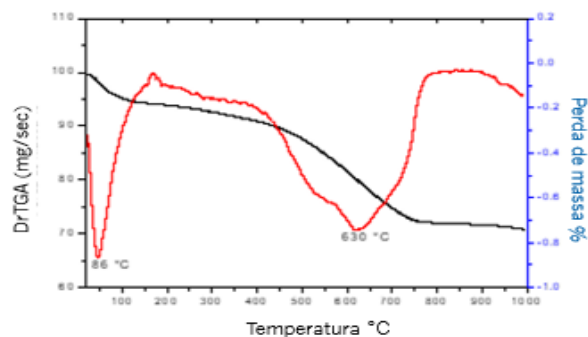
Na análise termogravimétrica, feita com o Exp 1, com tamanho de partícula de 45-100 μm antes e após as análises cromatográficas, foram obtidos os termogramas apresentados na Figura 20. Foi observado que o material após ser utilizado como FE apresentou uma perda de massa de 28%, uma diferença pequena em relação ao material antes das análises que teve uma perda de 26%, ou seja, não houve retenção considerável de analitos na fase estacionária.

Figura 20: Termograma do Exp 1: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

a)



b)



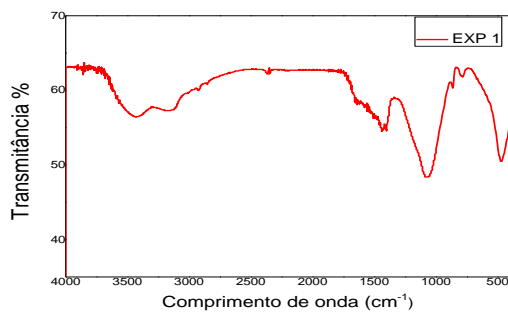
Fonte: Autora, 2019.

5.4.1.2. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

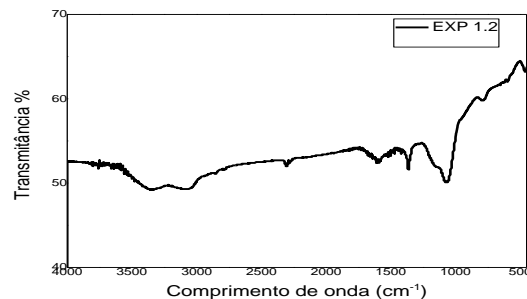
Na Figura 21, pode-se perceber que os sinais referentes aos grupos hidroxila são notados tanto no material antes dos testes cromatográficos (Exp 1) como no material após os testes (Exp 1.2), ou seja, os sinais permanecem presentes na amostra, além disso não foi visto a presença de outros sinais referentes aos analitos analisados na coluna.

Figura 21: Espectros do material a) antes dos testes cromatográficos (Exp 1); b) após os testes cromatográficos (Exp 1.2).

a)



b)

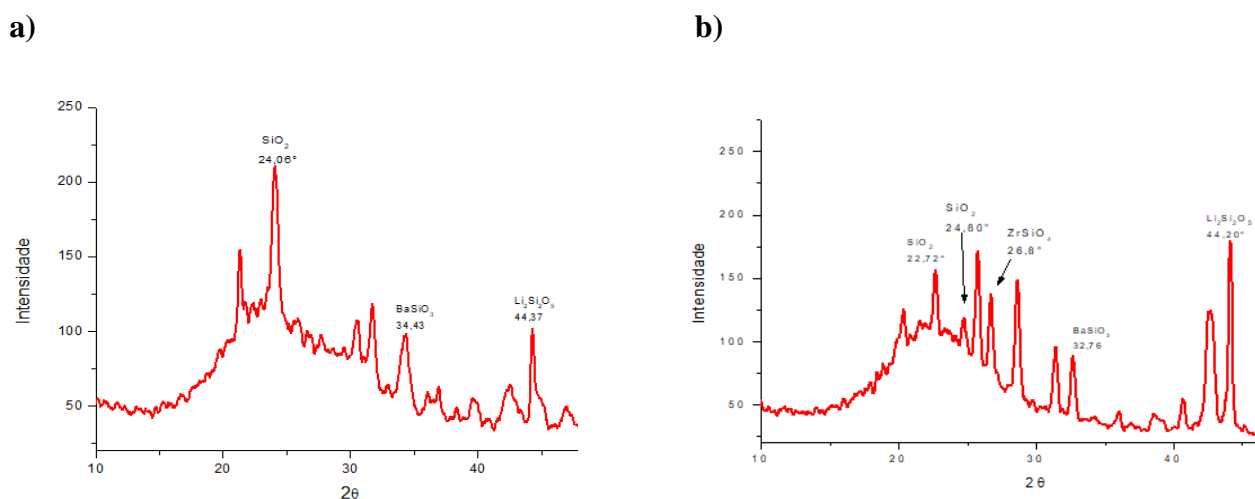


Fonte: Autora, 2019.

5.4.1.3. Difração de raios X (DRX)

Nas análises de DRX (Figura 22), foi observado que o material apresentou os sinais característicos dos silicatos com os óxidos metálicos incorporados, sendo possível observar outros sinais na amostra após as análises cromatográficas, o que pode ser explicado pela mudança de fase cristalina do material.

Figura 22: Difratomogramas do material a) antes dos testes cromatográficos (Exp 1); b) após os testes cromatográficos (Exp 1.2).



Fonte: Autora, 2019.

5.4.2. Caracterização do Experimento C

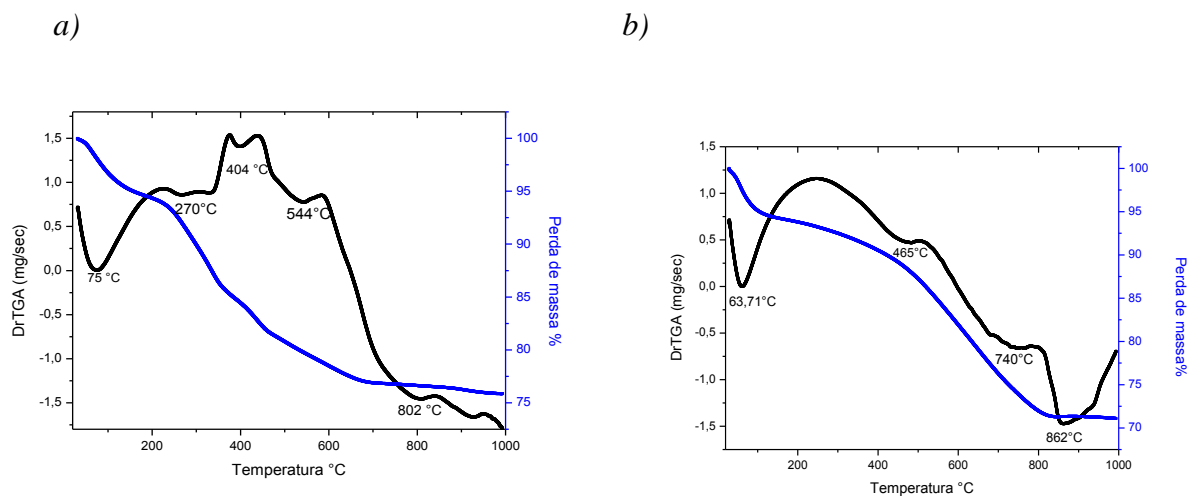
5.4.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)

O material obtido com o tamanho de partícula em uma faixa entre 10-45 μm foi caracterizado, antes e após os testes cromatográficos.

Na Figura 23 estão representados os termogramas obtidos. Na Figura 24-a é possível observar que a perda de massa total foi de 24%, sendo a primeira perda de massa em aproximadamente em 73 °C relacionada a eliminação de água (6,09%) e 18,05% relacionada a degradação da matéria orgânica. Na análise termogravimétrica (Figura 24-b), foi observada uma perda de massa de 28%, uma diferença que pode ser considerada significativa em relação ao

material antes das análises que teve uma perda de 24%, ou seja, se considera a possibilidade de retenção de analitos na fase estacionária.

Figura 23: Termograma do Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.



Fonte: Autora, 2019.

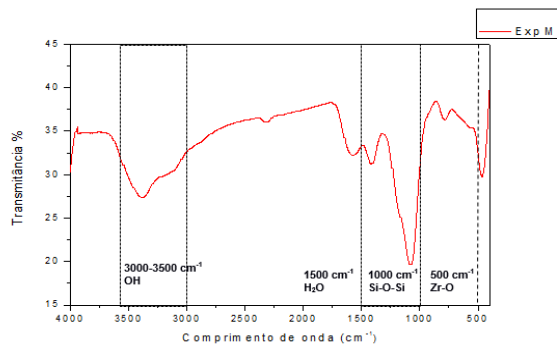
5.4.2.2. Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Através da análise de FTIR foram obtidos os espectros do material antes e após o uso em cromatografia (Figura 24). No espectro da Figura 24-a estão presentes todas as bandas características deste material, foi observada a banda próxima a 3500 cm^{-1} , característica do grupo OH que é essencial para a interação dos analitos com a FE, além da banda próxima de 1000 cm^{-1} que corresponde a Si-O-Si.

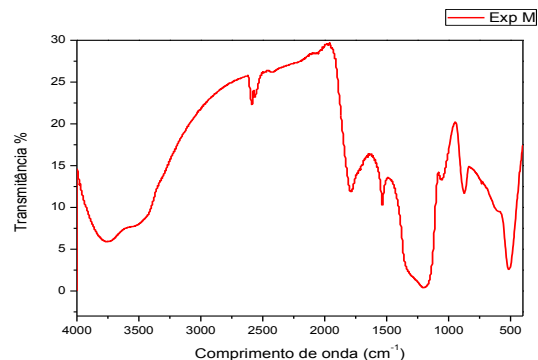
A partir das análises de FTIR (Figura 24-b), foi observado que os sinais referentes aos grupos hidroxila são notados tanto no material antes dos testes cromatográficos como no material após os testes, o que indica que os sinais permanecem presentes na amostra, também não foi visto a presença de outros sinais referentes aos analitos analisados na coluna, ou seja, não houve alteração na composição da FE.

Figura 24: Espectro de infravermelho do Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.

a)



b)



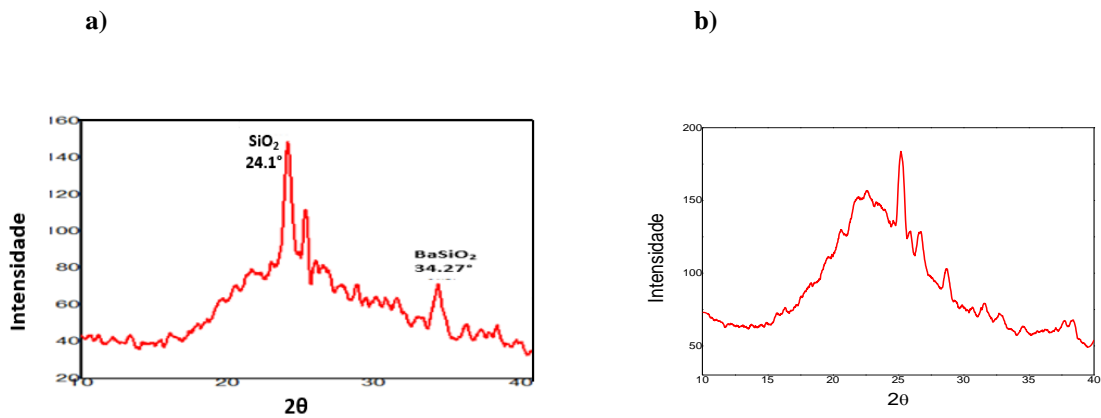
Fonte: Autora, 2019.

5.4.2.3. Difração de raios X (DRX).

Através do DRX (Figura 25-a), foi possível realizar a análise da composição estrutural do material formado, onde foram observados picos em regiões próximas a 24,1° referentes a SiO₂ na fase de α -quartzo, outros picos em 34,27° e 43,12° referente a BaSiO₃ e Li₂SiO₃, respectivamente.

Por meio das análises de DRX após os testes cromatográficos (Figura 25-b), foi observado que o material apresentou os sinais característicos dos grupos presentes na FE silicatos com os óxidos metálicos incorporados, porém houve diminuição do sinal referente a sílica indicando a possibilidade de lixiviação do material, além do aparecimento de novos sinais. A mudança na composição do material pode ter ocorrido devido a pressão na qual a FE foi submetida.

Figura 25: Difratoograma do Exp C: a) antes dos testes cromatográficos; b) após os testes cromatográficos.



Fonte: Autora, 2019.

6. CONCLUSÕES

Na otimização da etapa de calcinação foram estabelecidas as propriedades, 350 °C, 3°C/min e 3 horas as quais foram aplicadas as duas proporções de óxidos testadas.

Os materiais sintetizados, e posteriormente utilizados em testes cromatográficos, denominados Exp 1 e Exp C, foram caracterizados através da técnica de BET e foram determinadas as áreas superficiais de 220 e 249 m²/g, respectivamente. Esses dois materiais possuem composições e proporções diferentes da mistura de óxidos.

Também foram testadas diferentes proporções das misturas de óxidos utilizadas no Exp 1, sendo sintetizados outros dois materiais, Exp A e Exp B, porém esses materiais apresentaram áreas superficiais menores, logo os mesmos não foram aplicados nos testes cromatográficos.

O Exp C, de maior área superficial, foi escolhido para ser utilizado como FE tanto em CLC como em HPLC, enquanto o Exp 1 foi testado apenas como FE em HPLC.

Nas análises de CLC com a fase estacionária denominada Exp C (45-100 µm), não foi observada a separação dos compostos (MAG, DAG e TAG), entretanto, ao utilizar a metodologia descrita na literatura com sílica comercial também não houve separação, ou seja, o método precisa ser otimizado e portanto o estudo de CLC não foi conclusivo em relação a eficiência do material.

Em HPLC, após os testes e otimização do método cromatográfico, o Exp C foi a FE que se mostrou eficiente para separar os compostos ácidos: ADAB, ACNB e AMB. Em todos métodos utilizados, os compostos apresentaram tempos de retenção diferentes, porém quando utilizado o método isocrático com FM composta por 95:05 ACN:H₂O foi observado que a resolução entre os picos foi maior, indicando uma melhor eficiência da FE.

Por fim, os materiais utilizados como FE nos testes cromatográficos, Exp 1 e o Exp C, foram novamente caracterizados por meio das técnicas instrumentais e foi observado que houve algumas alterações em relação a sua composição, portanto os materiais não se mostraram totalmente estáveis.

7. PERSPECTIVAS

Diminuir ainda mais o tamanho das partículas do material, utilizando peneiras com menores tamanho de *mesh*, ou malhas, com intuito de aumentar a área superficial e conseqüentemente a sua eficiência cromatográfica.

Obter partículas com área superficial maior, a partir de mudanças na mistura das proporções dos óxidos utilizados.

Otimizar o método de CLC com sílica e após aplicar aos materiais desenvolvidos.

Realizar testes cromatográficos em HPLC, utilizando outros padrões analíticos.

8. REFERÊNCIAS

- AIROLDI, Claudio; FARIAS, Robson F. **Alcóxidos Como Precursores Na Síntese de Novos Materiais Através Do Processo Sol-Gel**. Química Nova, vol. 27, no 1, fevereiro de 2004.
- AQUINO NETO, Francisco R.; NUNES, Denise da Silva S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- BENHAIM, D., et al. **Effect of N-Octanol in the Mobile Phase on Lipophilicity Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography on a Modified Silica Column**. Journal of Chromatography A, vol. 1209, no 1–2, outubro de 2008, p. 111–19.
- BRAGA, Tiago Pinheiro et al. **Synthesis of hybrid mesoporous spheres using the chitosan as template**, *Journal of Non-Crystalline Solids*. v. 355, n. 14–15, p. 860–866, 2009.
- BUSTILLO TRUEBA, P., et al. **Validation of an Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantification of Cysteinylated Aldehydes and Application to Malt and Beer Samples**. Journal of Chromatography A, vol. 1604, outubro de 2019, p. 460467.
- CALPA, L.R.S. **Estudo preliminar da sinterização de membranas macroporosas de óxido de magnésio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia de Materiais, 2011.
- CARVALHO, M.S. et al. **Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.23, n. 4, p. 763-769, 2012.
- CAZES, Jack, organizador. **Encyclopedia of chromatography**. 2nd ed, Taylor & Francis, 2005.
- CHAN, Chung Chow, organizador. **Analytical method validation and instrument performance verification**. John Wiley & Sons, 2004.

CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CIOLA, Remolo. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

COLLINS, Carol H. “2006: **Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma**. *Química Nova*, vol. 29, nº 4, julho de 2006, p. 889–90. *SciELO*, doi:10.1590/S0100-40422006000400045.

COLLINS, Carol H., et al. “**The Search for More PH Stable Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography**”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 20, nº 4, 2009, p. 604–12. *SciELO*, doi:10.1590/S0103-50532009000400004.

CUSTODIO, R., et al. **Uma Análise das Determinações de Área Superficial de Nitrogênio sobre Sílicas e Modelagem de Interações entre estes Compostos**. XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. Campinas- SP, 22 a 23/09/2010.

DEGANI, A.L.G., et al. **Cromatografia um breve ensaio**. *Química nova na escola*. Cromatografia, n.7, maio, 1998.

DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists**. Wiley-Interscience, 2006.

EWING, Galen Wood. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. Tradução de Aurora G. Albanese e Joaquim T. S. Campos. São Paulo: Blucher, 1972.

FONSECA FILHO, H.D.; LOPES, G.A.C. **Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de difratometria de raios-X**. *Periódicos UNIFAP*, Macapá, v. 3, n. 1, p. 31-45, 2013

FUMAT, N., et al. **Effect of Operating Parameters on a Centrifugal Partition Chromatography Separation**. *Journal of Chromatography A*, vol. 1474, Novembro de 2016, p. 47–58.

GORAIEB, Karen, et al. **Preparação, caracterização e aplicação de fases estacionárias tipo C8 modificadas por óxidos metálicos para cromatografia líquida**. *Química Nova*, vol. 36, no 8, 2013, p. 1131–38.

GREGG S. J.; SING K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. Academic Press, London, 1982.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 8th ed, W.H. Freeman and Co, 2010.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HORIE, Kanta, et al. **Estimation and Optimization of the Peak Capacity of One-Dimensional Gradient High Performance Liquid Chromatography Using a Long Monolithic Silica Capillary Column**. *Journal of Chromatography A*, vol. 1228, Março de 2012, p. 283–91.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da termogravimetria análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. Araraquara: Giz editorial, 2004.

KAWACHI, Yuusuke, et al. **Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary Phases: Hydrophilicity, Charge Effects, Structural Selectivity, and Separation Efficiency**. *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no 35, Setembro de 2011, p. 5903–19.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. 2.ed. Campinas: Átomo, 2016.

LI, Jia-Fu, et al. **On-Line Comprehensive Two-Dimensional Normal-Phase Liquid Chromatography×reversed-Phase Liquid Chromatography for Preparative Isolation of Toad Venom**. *Journal of Chromatography A*, vol. 1456, Julho de 2016, p. 169–75.

LINDSAY, S. **High performance liquid chromatography**, Chichester: Wiley, 1993.

MALDANER, Liane, et al. **“Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa”**. *Química Nova*, vol. 33, nº 7, 2010, p. 1559–68.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Química Nova, vol. 32, nº1, 2009, p. 214–22.

MÜHLEN, Carin von; LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia unificada.** Química Nova, vol. 27, nº 5, Outubro de 2004, p. 747–53.

NAWROCKI, J., et al. **“Part I. Chromatography Using Ultra-Stable Metal Oxide-Based Stationary Phases for HPLC”.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1028, nº 1, fevereiro de 2004, p. 1–30.

NAWROCKI, J., et al. **Part II. Chromatography Using Ultra-Stable Metal Oxide-Based Stationary Phases for HPLC.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1028, no 1, fevereiro de 2004, p. 31–62.

NAZARIO, Carlos Eduardo Domingues, e Fernando Mauro Lanças. **“Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências”.** *Scientia Chromatographica*, vol. 5, no 2, 2013, p. 111–35.

NOGUEIRA, N. M.; et al. **Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada.** *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 92, nº 2, p. 44-45, 2011.

ÓRFÃO, J. J. M.; FIGUEIREDO, J. L. **Fisissorção em Sólidos Macro e Mesoporosos.** Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 2001.

PACHECO, Sidney, et al. **History of Liquid Chromatography.** *Revista Virtual de Química*, vol. 7, nº 4, 2015, p. 1225–71. *Crossref*, doi:10.5935/1984-6835.20150069.

PARK, Soo Hyun, et al. **Localised Quantitative Structure–Retention Relationship Modelling for Rapid Method Development in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Chromatography A*, Setembro de 2019, p. 460508.

PERETZKI, A. J., et al. **On-Chip Integration of Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography and Droplet Microfluidics Introducing Ethylene Glycol as Polar Continuous Phase for the Compartmentalization of n-Heptane Eluents.** *Journal of Chromatography A*, Novembro de 2019, p. 460653.

POOLE, Colin F. **Reversed-Phase Liquid Chromatography System Constant Database over an Extended Mobile Phase Composition Range for 25 Siloxane-Bonded Silica-Based Columns.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1600, Agosto de 2019, p. 112–26.

PRADO, A. G. S., et al. **Aplicação e Modificação Química Da Sílica Gel Obtida de Areia.** *Química Nova*, vol. 28, no 3, junho de 2005, p. 544–47.

QUINLIN, Patricia; Herman J. Weiser. **Separation and Determination of Mono-, Di-, and Triglycerides in Monoglyceride Concentrates.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 35, no 7, julho de 1958, p. 325–27.

QIU, H., et al. **Development of Silica-Based Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 399, no 10, abril de 2011, p. 3307–22.

RANDON, J., et al. **Zirconia Based Monoliths Used in Hydrophilic-Interaction Chromatography for Original Selectivity of Xanthines.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no 9, Fevereiro de 2010, p. 1496–500.

SALGADO, Bruno César B.; VALENTINI, Antoninho. **Synthesis and Photocatalytic Performance of Macroporous Spheres of Silica Coated with Titanium Dioxide.** *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 2291–2310, 2015

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. **Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes.** *Química Nova*, vol. 34, nº 4, 2011, p. 665–76.

SING, K. **The Use of Nitrogen Adsorption for the Characterization of Porous Materials: Review.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 187–188, p. 3–9, 2001.

SRIVASTAVA, ManMohan, organizador. **High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC).** Springer Berlin Heidelberg, 2011.

TONHI, Edivan, et al. **Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados.** *Química Nova*, vol. 25, nº 4, julho de 2002, p. 616–23.

VALENTINI, A.; et. al. **Synthesis of Mesoporous Al₂O₃ Macrospheres Using the Biopolymer Chitosan as a Template: A Novel Active Catalyst System for CO₂ Reforming of Methane.** *Materials Letters*, vol. 59, no 29–30, Dezembro de 2005, p. 3963–67.

VIEIRA, Andressa T., et al. **Stationary Phase Based on Cellulose Dodecanoate Physically Immobilized on Silica Particles for High-Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1572, Outubro de 2018, p. 72–81.

WELLINGS, Donald A. **A Practical Handbook of Preparative HPLC.** Elsevier Science, 2006

WU, Chi-san, organizador. **Handbook of size exclusion chromatography.** Dekker, 1995.

ZHAO, Wenjie, et al. **Preparation and Evaluation of Pillararene Bonded Silica Gel Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Chromatography A*, vol. 1485, Fevereiro de 2017, p. 44–51.