

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RENATA MAYUMI SAITO

**Utilização da eletroforese capilar com eletrólito não-
tamponado para o estudo do comportamento dos
íons hidrônio e hidroxila e seu desdobramento
analítico**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/05/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Renata Mayumi Saito

**Utilização da eletroforese capilar com eletrólito não-
tamponado para o estudo do comportamento dos
íons hidrônio e hidroxila e seu desdobramento
analítico**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Química (Química Analítica)*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo

2007

*Aos meus pais, Flávio e Regina, que deram-me
apoio e liberdade para que eu pudesse trilhar
meus próprios caminhos.*

*Aos meus avós, Satina e Hideo, a gratidão por
seu amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Claudimir pela orientação, confiança, palavras de incentivo e pela liberdade concedida durante todo o trabalho.

Aos professores Ivano Gutz e Lúcio Angnes pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos professores Dosil e Eduardo pelos conhecimentos transmitidos e pelo incentivo no início do mestrado.

Ao Osmar pelo carinho e pela compreensão, força e incentivo nos momentos de dificuldade.

Aos amigos Thiago BL e Lúcia pelo apoio, companheirismo e momentos de descontração.

Ao “Produção”, Lucas Blanes, pelas risadas e pelos trabalhos em conjunto.

Ao Carlos, por todos os ensinamentos.

Ao Fernando, Vinny, Marlene e Audrey pelo auxílio nos problemas diários.

Ao pessoal do laboratório: André, Caracol, Dani, Erika, Escobar, Fabs,

Heron, João, Zé Geraldo, Ju, Kléééston, Marcos, Minoru, Pedro,

Pimenta, Pop, Socorro, Wandão e William.

À Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo pelos auxílios prestados.

À Dona Miriam e Dona Maria da copa pelos inúmeros cafés.

Às amigas Raquel e Claudia pelo carinho e apoio nos momentos de dificuldade.

As amigos e funcionários do IQ-USP.

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Saito, R.M. **Utilização da eletroforese capilar com eletrólito não-tamponado para o estudo do comportamento dos íons hidrônio e hidroxila e seu desdobramento analítico.** 2007. 79 pp. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, foram efetuados estudos sobre o comportamento eletroforético dos íons hidrônio (H_3O^+) e hidroxila (OH^-) utilizando eletroforese capilar em zona em meio não-tamponado e detecção condutométrica sem contato. Alterações na composição do eletrólito de corrida devido à eletrólise foram evitadas empregando um sistema de eletrólise separada. A determinação de ácidos com pK_a s menores ou iguais ao pH do eletrólito de corrida foi possível. A possibilidade da análise em bases fortes também foi demonstrada. Eletrólitos de corrida com pH entre 4,5 e 7,0 (para o H_3O^+) e entre 7,0 e 9,0 (para o OH^-) mostraram-se favoráveis para a análise. Ambas as espécies apresentaram interação com os grupos silanóis do capilar. Dificuldades na análise do íon OH^- decorreram também de: reação da sílica com o analito e com o eletrólito de corrida e absorção de CO_2 atmosférico. A mobilidade do íon H_3O^+ medida foi 8% abaixo da obtida por outras técnicas. A curva para determinação de OH^- em base forte, com solução de trifluoracetato de lítio 10 mmol L^{-1} (pH 8,5) como eletrólito de corrida, mostrou boa linearidade na faixa de 0,5 a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As curvas de quantificação de H_3O^+ titulável em amostras de ácidos fortes, fracos e suas misturas, com solução de LiCl (pH 5,5) como eletrólito de corrida, apresentaram ampla faixa de resposta linear, com boa linearidade, ao redor de 0,05 a 10 mmol L^{-1} .

Palavras-chave: hidrônio, hidroxila, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato, eletrólise separada

ABSTRACT

Saito, R.M. **The use of capillary electrophoresis with unbuffered running electrolyte to study hydronium and hydroxyl behavior and its analytical outcome.** 2007. 79 pp. Masters Thesis. Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, studies about the electrophoretic behavior of hydronium (H_3O^+) and hydroxyl (OH^-) ions using capillary zone electrophoresis in unbuffered medium and contactless conductivity detection were developed. Variations in running electrolyte composition due to electrolysis were avoided using an electrolysis separated system. The analysis of acids with the same or lower pK_a than the running electrolyte pH was possible. The possibility of strong bases analysis was demonstrated as well. Good results were achieved using running electrolytes with pH between 4.5 and 7.0, for H_3O^+ analysis, and between 7.0 and 9.0, for OH^- analysis. Both species interacted with the silanol groups of silica capillary. Other problems in the determination of OH^- were: reaction of silica with the analyte as well as with the running electrolyte and absorption of atmospheric CO_2 . The H_3O^+ mobility calculated was 8% lower than values obtained in the literature. Analytical curve of OH^- ion in strong base, using 10 mmol L^{-1} lithium trifluoroacetate (pH 8.5) as running electrolyte, resulted in good linearity in a range of 0.5 to 7.0 mmol L^{-1} . Analytical curves of titratable hydronium ion in samples of strong and weak acids, as well in their mixture, using 10 mmol L^{-1} LiCl (pH 5.5) as running electrolyte, resulted in wide linear range (0.05 mmol L^{-1} to 10 mmol L^{-1}).

Keywords: hydronium, hydroxyl, capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, electrolysis separated

SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
1.1. Ácidos e bases.....	8
1.1.1. O transporte de prótons em meio aquoso.....	10
1.1.2. Métodos de determinação de íons hidrônio e hidroxila.....	12
1.2. Eletroforese capilar.....	14
1.2.1. O fluxo eletroosmótico	16
1.2.2. Picos de sistema.....	17
1.2.3. Sistemas de detecção.....	18
1.2.4. Eletrólise separada.....	20
2. Objetivos.....	24
3. Análise de íons hidrônio.....	25
3.1. Introdução.....	25
3.2. Experimental	25
3.2.1. Materiais e métodos.....	25
3.2.2. Equipamento	26
3.2.3. Condicionamento do capilar.....	27
3.3. Resultados e discussões.....	28
3.3.1. Efeito do pH na análise de íons H_3O^+ - Simulações computacionais.....	29
3.3.2. Interação do H_3O^+ com a coluna capilar	35
3.3.3. Modificação do capilar.....	40
3.3.4. Análise de H_3O^+ em meio não aquoso.....	44
3.3.5. Picos de sistema.....	45
3.3.6. Quantificação.....	46

3.3.7. Determinação do número de hidrogênios tituláveis.....	50
3.3.8. Estimativa da mobilidade do íon hidrônio.....	54
3.4. Conclusões parciais	58
4. Análise de íons hidroxila.....	61
4.1. Introdução.....	61
4.2. Experimental	61
4.3. Resultados e discussões.....	62
4.3.1. Condições para a análise do íon hidroxila.....	62
4.3.2. Repetibilidade	65
4.3.3. Picos de sistema.....	68
4.3.4. Quantificação.....	69
4.4. Conclusões parciais.....	70
5. Conclusões e perspectivas.....	72
6. Referências bibliográficas.....	75

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. Ácidos e bases

A origem do conceito de ácidos e das bases é muito antiga. Descrições sobre seu surgimento e o desenvolvimento das modernas teorias ácido-base foram relatados por vários autores [1][2][3][4].

O termo ácido teve origem na palavra em latim *acidus*, que significa azedo. Por sua vez, o termo álcali se originou do árabe *al qaliy*, significando cinzas vegetais. O termo base foi adotado para designar os álcalis (Na_2CO_3 , K_2CO_3 , NaOH), as terras (CaO , MgO) e os metais (Fe , Zn), sendo introduzido pelo francês Duhamel du Monceau em 1736, sendo depois adotado e popularizado por G.G. Rouelle em 1754.

Em 1664, Robert Boyle publica o livro “*Experimental History of Colours*”, onde ele relata seu trabalho com substâncias coloridas que têm suas cores alteradas na presença de ácidos ou álcalis. Dentre as substâncias estudadas, estão o tornassol e o corante vermelho extraído do pau-brasil.

Em 1729, C. Geoffroy realiza a primeira titulação (Na_2CO_3 com vários tipos de vinagres) e, em 1767, W. Lewis utiliza pela primeira vez um indicador em uma titulação.

Em 1789, A. Lavoisier propôs que todo ácido deveria ter oxigênio. No entanto, C. Berthollet (1787) e depois H. Davy (1810) descreveram vários ácidos que não continham o oxigênio, como, por exemplo, HCN , H_2S e HCl , entre outros. O comportamento ácido-base foi atribuído ao hidrogênio somente em 1838, quando J.

Liebig chegou a afirmar: “*ácidos são compostos de hidrogênio, nos quais o hidrogênio pode ser substituído por metais*” [1].

A primeira teoria ácido-base, desenvolvida com o intuito de definir e procurar sistematizar e explicar fatos químicos ligados ao comportamento ácido-base, foi a teoria de Arrhenius (1887), que surgiu como parte de sua Teoria de Dissociação Eletrolítica. Segundo ela, ácido é toda substância que, em água, produz íons H^+ e base é toda substância que produz íons OH^- (hidroxila ou oxidrila). A reação destas duas espécies resultaria em água. Pela teoria da dissociação eletrolítica, Arrhenius foi contemplado com o Prêmio Nobel, em 1904.

A teoria de Arrhenius sobre ácidos e bases provocou o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa, dentre elas a lei de diluição de Ostwald (1887), a equação de Nernst (1888-9) que relaciona o potencial de pilhas com a concentração dos íons, a determinação da concentração de íons H^+ através do eletrodo de vidro (Le Blanc, 1893), o efeito tampão (Fernbach, 1900), a determinação da constante de dissociação da água (Heydeweller, 1909), o conceito de pH (Sørensen, 1909), entre outras.

Como críticas à teoria proposta por Arrhenius, surgiram outras novas: teoria protônica (1923), proposta, independentemente, por T. Lowry e J. Bronsted; teoria dos sistemas solventes (1920); teoria do par eletrônico, proposta por Lewis inicialmente em 1923 e novamente em 1938, quando finalmente foi aceita; teoria de Lux (1939), para sistemas envolvendo óxidos e sais fundidos; teoria ionotrópica (1954). Detalhes sobre estas teorias podem ser encontrados na literatura [5].

Em meio aquoso, o íon H^+ (próton) é melhor representado por H_3O^+ . Essa espécie pode também ser denominada hidrônio ou hidroxônio.

1.1.1. O transporte de prótons em meio aquoso

A alta mobilidade do íon H^+ em meio aquoso é a principal característica que o distingue das demais espécies iônicas. A mobilidade do próton em água é quase 7 vezes maior que a mobilidade de um cátion de um metal alcalino com tamanho similar ao do H^+ (por exemplo Na^+). Esse comportamento anômalo até hoje vem sendo bastante investigado [6][7][8][9][10][11]. O modelo mais utilizado para explicar tal fenômeno é o mecanismo de Grotthuss [12], também chamado de mecanismo de “difusão estrutural” para diferenciá-lo da “difusão hidrodinâmica”, que descreve a migração dos demais íons em meio aquoso. Segundo esse mecanismo, o próton é capaz de se transportar de uma molécula de água para outra, através do rearranjo das ligações de hidrogênio e da reorientação das moléculas de água.

No entanto, esse modelo foi interpretado de várias maneiras. Glasstone, Laidler e Eyring [13] concluíram que a transferência do próton seria a etapa limitante do mecanismo, sendo que a rotação da água seria um processo rápido. Já Conway, Bockris e Linton [14] e outras teorias baseadas nas idéias de Eigen e colaboradores concordam que a transferência do próton é rápida, porém atribuem a etapa limitante à reorganização das ligações de hidrogênio envolvidas no processo de condução do mesmo.

Por volta de 1936, Huggins postulou a existência da estrutura $H_5O_2^+$ [15], posteriormente denominado estrutura de Zundel, na qual duas moléculas de água partilham um único próton em excesso. Mais tarde, propôs-se a estrutura de Eigen, $H_9O_4^+$ [16], onde quatro moléculas de água partilham um próton em excesso.

Teorias mais recentes propõem que a condução de prótons ocorre como resultado da isomerização entre as estruturas de Zundel e Eigen [8]. Nesse caso, a etapa limitante é a quebra da ligação de hidrogênio na segunda camada de

solvatação, que permite a troca de uma das moléculas de água por outra diferente. Esse modelo foi denominado de mecanismo de Moisés¹ [17] e diverge das teorias mais antigas, nas quais a molécula de água imediatamente adjacente ao H_3O^+ se rotaciona até atingir uma configuração apropriada para receber o próton [16].

O íon OH^- também possui mobilidade anormalmente alta quando comparada a dos demais ânions. Acredita-se que a alta mobilidade seja reflexo da migração do OH^- através de um mecanismo semelhante ao de Grotthuss, no qual os íons OH^- se movem de uma molécula de água para outra em virtude da transferência de prótons no sentido inverso [16]. Neste caso, o OH^- migra através da transferência de prótons entre a molécula de H_2O e o OH^- , enquanto que na migração do H^+ , ocorre transferência do próton do H_3O^+ para a molécula de água. A etapa limitante da mobilidade do OH^- é a mesma do H^+ : a quebra da ligação de hidrogênio na segunda camada de solvatação [18].

A redução da mobilidade do OH^- frente ao H^+ foi explicada de diversas formas. Bernal e Fowler [19] propuseram que os dois prótons ligados ao H_2O doador são ligados mais fortemente que os três prótons ligados ao H_3O^+ doador. Gierer e Wirtz [20] sugeriram um mecanismo de cargas: no transporte de H^+ , ocorre transferência de prótons entre moléculas de água neutras, enquanto que no transporte de OH^- o próton se transfere entre duas cargas residuais negativas. Agmon [18] propôs que a contração da distância da ligação O-O acrescenta $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o transporte do OH^- [20].

Técnicas para determinação de mobilidades iônicas envolvem, em geral,

¹Essa denominação surgiu como analogia das ligações de hidrogênio se quebrando e se reestruturando para a passagem do próton com a passagem de Moisés pelo Mar Vermelho (cf. Êxodo 14, 21-27).

medidas de número de transporte, que corresponde à fração da corrente total relacionada a uma determinada espécie. Em termos de mobilidade, para um eletrólito 1:1, ou seja, composto por um cátion e um ânion, ambos univalente, o número de transporte pode ser expresso como:

$$t_+ = \frac{\mu_+}{\mu_+ + \mu_-} \quad \text{Eq.1}$$

onde t é o número de transporte, μ é a mobilidade da espécie e os índices $+$ e $-$ se referem a cátion e ânion, respectivamente.

Um dos métodos mais precisos para se medir o número de transporte é o método da fronteira móvel, no qual o movimento da fronteira entre duas soluções iônicas contendo um íon em comum é monitorado através da medida da corrente que flui pelo sistema. Outra técnica bastante utilizada é o método de Hittorf. Nesse método, uma célula eletrolítica é dividida em três compartimentos contendo a mesma solução problema e faz-se passar por ela uma corrente. O número de transporte da espécie de interesse pode, então, ser deduzido a partir da determinação de sua concentração em um dos compartimentos [21][22].

1.1.2. Métodos de determinação de íons hidrônio e hidroxila

As técnicas clássicas, como potenciometria e titulação volumétrica, ainda são as mais utilizadas na quantificação de íons H_3O^+ e OH^- .

A potenciometria é uma técnica baseada na medida do potencial de um eletrodo em uma solução em relação a um eletrodo de referência. No que se refere

ao estabelecimento da atividade de íons H_3O^+ , em geral são utilizados eletrodos íon seletivos, dos quais o mais utilizado é o eletrodo de vidro. Esse tipo de análise é rápida e de fácil manipulação, além de possuir uma instrumentação simples e de custo relativamente baixo quando comparada a outras técnicas instrumentais. No entanto, alguns fatores podem causar erros nas medidas [23], tais como o potencial de junção, interferências do Na^+ em soluções muito alcalinas, levando a medidas menores que o valor real (erro alcalino), ou à saturação de íons H_3O^+ em soluções muito ácidas, ocasionando medidas maiores que o valor verdadeiro (erro ácido).

Diferentemente da potenciometria, que mede a atividade hidrogeniônica, a titulação ácido-base fornece a quantidade total de hidrogênios/hidroxilas tituláveis. O ponto final, ou ponto de equivalência da titulação pode ser obtido através de indicadores visuais, por medidas potenciométricas ou condutométricas. As análises titulométricas são técnicas que fornecem resultados com grande exatidão e precisão e podem ser facilmente automatizadas. No entanto, suas desvantagens consistem nos altos limites de detecção (tipicamente na faixa de mmol L^{-1}) e, principalmente, nos grandes volumes de amostra necessários para a análise e de resíduos gerados.

Mais recentemente, a cromatografia de íons surgiu como alternativa às técnicas clássicas. Dasgupta e colaboradores [24] mostraram a análise de íons hidrônio utilizando uma coluna de troca catiônica de poliestireno sulfonado, utilizando solução de etanosulfonato como fase móvel e detecção condutométrica. A cromatografia de íons permite a análise simultânea de outras espécies, embora a quantidade de amostra injetada e de resíduos gerados seja relativamente grande.

Trabalhos envolvendo a determinação de ácidos utilizando a eletroforese capilar em zona [25] e a isotacoforese [26] já foram relatados, embora tivesse sido realizada indiretamente, através de seus ânions correspondentes. Porém, em

amostras contendo mais de um ácido, a quantificação de íons H_3O^+ exige tratamentos matemáticos envolvendo balanços de carga e massa e assim, para amostras complexas, esse trabalho pode se tornar árduo.

1.2. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (EC) consiste em uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de espécies iônicas ou ionizáveis sob ação de um campo elétrico. A modalidade mais utilizada de EC é a eletroforese capilar em zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), também chamada de eletroforese capilar em solução livre (FSCE, *free solution capillary electrophoresis*). Nesta modalidade, preenche-se um tubo capilar com um eletrólito. A injeção da amostra no interior do capilar pode ser realizada hidrodinamicamente - por diferença de pressão ou pela ação da gravidade - ou eletrocineticamente. A aplicação de uma diferença de potencial da ordem de 10 a 30 kV nas extremidades do capilar proporciona a migração das espécies iônicas ou ionizáveis como zonas independentes, de acordo com sua mobilidade, sendo esta dependente da carga e do raio do íon solvatado.

A introdução de colunas com dimensões capilares (15 a 100 μm) proporcionaram um grande avanço no desenvolvimento da eletroforese, pois permitiram a aplicação de elevados potenciais elétricos. A grande área superficial relativa ao volume no interior da coluna acarreta em uma eficiente dissipação do calor causado pelo efeito Joule. Dessa forma, praticamente não existe movimento convectivo no interior do capilar e o alargamento de bandas se deve quase que somente à difusão, resultando em uma técnica de alta eficiência (com aproximadamente 1 milhão de pratos teóricos) [27].

Outra vantagem da eletroforese capilar deve-se às quantidades bastante reduzidas de amostra necessária para a análise (apenas algumas unidades de μL , sendo que o volume injetado é da ordem de somente 1 a 10 nL). Além disso, o volume de resíduos gerados também é extremamente baixo, somente algumas unidades de mililitros de solução são suficientes para um dia de análise.

A eletroforese foi descrita inicialmente por Tiselius em 1930 [28]. Nesse trabalho, ele utilizou o método da fronteira móvel para separar algumas proteínas do soro sanguíneo. Esse trabalho inovador lhe garantiu o Prêmio Nobel em 1948.

Em 1967, Hjerten [29] demonstrou a utilização de campos elétricos elevados (aproximadamente 75 V cm^{-1}), utilizando tubos capilares de $300 \mu\text{m}$ de diâmetro interno. Em 1974, Virtanen [30] reportou as vantagens da redução do efeito Joule com a utilização de colunas com diâmetros menores (50 a $200 \mu\text{m}$). Mikkers e colaboradores [31] fizeram a primeira demonstração de eletroforese capilar em zona em tubos de Teflon de $200 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, mostrando a separação de 16 ânions em 10 minutos.

No entanto, a demonstração mais aceita sobre o poder da eletroforese capilar veio com os trabalhos de Jorgenson e Lukacs no início da década de 80. Neles, os autores demonstravam a alta eficiência de separação utilizando campos elétricos elevados, com colunas capilares menores que $100 \mu\text{m}$ de diâmetro interno [32].

Também foram relevantes as contribuições de Terabe e colaboradores [33], que introduziram a eletrocromatografia micelar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Chromatography*), na qual a adição de surfactantes à solução forma um meio micelar capaz de separar moléculas neutras.

Em 1987, Cohen e Karger [34][35] desenvolveram a eletroforese capilar em gel, que inseriu um novo parâmetro no mecanismo de separação: o tamanho da

molécula. Recentes desenvolvimentos instrumentais permitiram o desenvolvimento de equipamentos comerciais para eletroforese capilar em gel com até 96 capilares. Sem dúvida, um dos principais avanços que viabilizaram o projeto genoma. Ainda hoje, o desenvolvimento da proteômica e da metabolômica se beneficiam largamente dessa técnica.

1.2.1. O fluxo eletroosmótico

Dentre os vários materiais empregados na fabricação de capilares, o mais amplamente utilizado é a sílica fundida, uma espécie de dióxido de silício amorfo. Esse fato se deve a algumas de suas propriedades, tais como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência a ataques químicos, dentre outros [27].

A sílica fundida possui vários tipos de grupos silanóis, os quais possuem caráter ácido. Dependendo do pH da solução que preenche o capilar (tipicamente > 2), esses grupos podem se ionizar, conferindo um caráter negativo à superfície interna do mesmo. Uma vez que a superfície interna desenvolve densidade de carga negativa, cátions do eletrólito de corrida são, então, atraídos para a superfície da sílica, formando uma distribuição não-homogênea de cargas, chamada de dupla camada elétrica. A aplicação de um campo elétrico impulsiona os íons positivos na direção do cátodo (pólo negativo) e, estando estas espécies hidratadas, elas arrastam o solvente, gerando um movimento da solução como um todo, chamado de fluxo eletroosmótico (EOF, *electroosmotic flow*).

Dessa forma, como o EOF impulsiona todas as espécies que estão no interior

do capilar, a mobilidade eletroforética do analito possui como componentes sua mobilidade efetiva, que é dependente de suas propriedades específicas como carga e tamanho, e a mobilidade do fluxo eletroosmótico. Assim, o controle do EOF possibilita melhorar a performance das separações através da modificação das mobilidades aparentes dos analitos. Os métodos de controle mais comumente empregados exploram alterações nas propriedades físico-químicas do eletrólito de corrida, tais como pH, força iônica, viscosidade ou adição de aditivos orgânicos [36][37]. Também é possível alterar a densidade de carga superficial da coluna através de revestimentos físicos ou métodos de derivatização química [38][39]. Finalmente, pode-se controlar o fluxo eletroosmótico através da aplicação de um campo elétrico externo aplicado na direção radial ao capilar [40][41].

1.2.2. Picos de sistema

O surgimento de picos de sistema é um fenômeno relativamente comum em análises por eletroforese capilar [42][43][44][45]. Eles surgem a partir da formação de zonas de concentração decorrentes de uma perturbação na composição do eletrólito de corrida causada pela injeção de qualquer tipo de amostra. Assim, dependendo do eletrólito de corrida e das condições de análise utilizadas, é possível observar sinais com mobilidade diferente do EOF, mesmo quando se injeta apenas água pura. Por exemplo, quando se utiliza um eletrólito de corrida contendo CTAB, um surfactante usado comumente como inversor de EOF na análise de ânions, freqüentemente se observam picos de sistema com mobilidade próxima à do brometo [46]. O eletroferograma de qualquer tipo de amostra, ou mesmo de água, utilizando esse eletrólito de corrida apresenta sempre um pico com mobilidade

aproximadamente igual à do brometo, mesmo que a amostra não contenha essa espécie ou qualquer outra que com ela co-migre.

Gaš e Kenndler demonstraram que eletrólitos de corrida muito ácidos ($\text{pH} < 5$) ou muito básicos ($\text{pH} > 9$) podem apresentar picos de sistema com mobilidades características de espécies catiônicas ou aniônicas, respectivamente. Entretanto, o módulo da mobilidade é dependente do pH do eletrólito de corrida, podendo ser calculado através de equações apropriadas [42].

1.2.3. Sistemas de detecção

Desde a implementação da técnica de eletroforese capilar, o desenvolvimento de novos sistemas de detecção tem sido uma área de grande interesse [47][48][49]. Alguns dos critérios utilizados na escolha de um detector incluem: sensibilidade, seletividade, limite de detecção, ruído e faixa de resposta linear.

Os detectores podem ser classificados em dois tipos: seletivos e universais. Os detectores seletivos medem uma propriedade específica do analito. Portanto, a análise é limitada às espécies que possuem uma determinada propriedade. O uso desse tipo de detecção é vantajoso quando a matriz da amostra é complexa ou quando se deseja minimizar efeitos de *background*. Pertencem a esta classe, os detectores amperométricos, radiométricos, os espectrômetros de massa e os fotodetectores baseados em absorção UV/Vis, fluorescência ou espalhamento Raman.

Os detectores universais respondem a diferenças entre uma propriedade do analito e do eletrólito de corrida e, em geral, seu uso é vantajoso quando se tem completa separação de todas as espécies da amostra. Como exemplo, podem ser

citados os detectores condutométricos, de índice de refração e os detectores empregando métodos indiretos.

A detecção condutométrica ganhou destaque com a cromatografia de íons e desde sua introdução como método de detecção em eletroforese capilar, demonstrou grande potencial na análise de íons [50][51]. Posteriormente, ela também se mostrou uma poderosa ferramenta na análise de compostos neutros, por MEKC [52]. Esse tipo de detecção pode ser considerada como uma boa alternativa aos métodos fotométricos, principalmente em regiões de baixas concentrações, nas quais um dos problemas dos métodos indiretos na faixa do UV/Vis é a baixa sensibilidade.

No entanto, a interferência do alto potencial de separação na detecção condutométrica consiste em um obstáculo para a técnica. Assim, Fracassi da Silva e do Lago [53] e Zemann e colaboradores [54] desenvolveram, quase que simultaneamente e de forma independente, um sistema com um par de eletrodos posicionados no exterior de capilar, resultando em um novo método de detecção: a detecção condutométrica sem contato (CCD – *contactless conductivity detection*). Posteriormente, o CCD foi também denominado C⁴D (*capacitively coupled contactless conductivity detection*). Nesse tipo de detecção, um sinal alternado de alta frequência é aplicado através de dois eletrodos. Como a reatância capacitiva diminui com o aumento da frequência, a impedância do capilar se reduz, e um sinal significativo de variação pode ser observado entre os eletrodos sem contato com a solução [55]. Esse arranjo possui como vantagens a eliminação de problemas com contaminação do eletrodo e da interferência do campo elétrico de separação.

Por se tratar de um sistema de detecção universal, o C⁴D responde a variações de condutividade entre o analito e o eletrólito de corrida, sendo que, para

eletrólitos fortes, quanto maior a diferença de mobilidade entre o analito e o co-íon do eletrólito, maior a sensibilidade, assim como quanto maior for a mobilidade do contra-íon [56][57].

A detecção condutométrica sem contato possui a vantagem da simplicidade de instrumentação frente aos sistemas ópticos, que possuem alto custo e maior dificuldade de manutenção.

1.2.4. Eletrólise separada

Embora a eletroforese capilar seja considerada predominantemente uma técnica analítica de separação, é possível identificar um equipamento de eletroforese capilar como uma célula eletroquímica. Assim, a corrente necessária para promover a separação das espécies e o fluxo eletroosmótico no interior do capilar também provoca reações de oxido-redução da solução presente nas duas semi-celas. Na ausência de espécies eletroativas no eletrólito de corrida, ocorre a eletrólise da água, que acarreta alterações no pH da solução durante a análise.

Uma vez que o pH tem influência direta na mobilidade efetiva das espécies, a alteração do pH do eletrólito de corrida não só ocasiona mudanças no fluxo eletroosmótico, como também pode levar à perda de resolução e eficiência da separação [58]. Para compensar esse efeito, geralmente são utilizados tampões como eletrólitos de corrida. As desvantagens em se utilizar tal estratégia consistem na restrição da composição do eletrólito de corrida, bem como na modificação da composição do eletrólito de corrida devido à reação de espécies eletroativas, cujos efeitos não são compensados pelo tampão.

Com o intuito de minimizar esse problema, de Jesus e colaboradores

propuseram um sistema de eletrólise separada contendo quatro reservatórios [59]. Em dois destes reservatórios encontram-se imersas as extremidades da coluna capilar e nos outros dois estão os eletrodos responsáveis pela aplicação da alta tensão. Os reservatórios contendo o capilar são ligados, dois a dois, aos de alta tensão através de pontes salinas preenchidas com o próprio eletrólito de corrida. Esquemas de equipamentos de EC comparando (A) o sistema convencional e (B) o sistema de eletrólise separada são mostrados na figura . A figura mostra uma foto da implementação da eletrólise separada em um equipamento de eletroforese capilar.

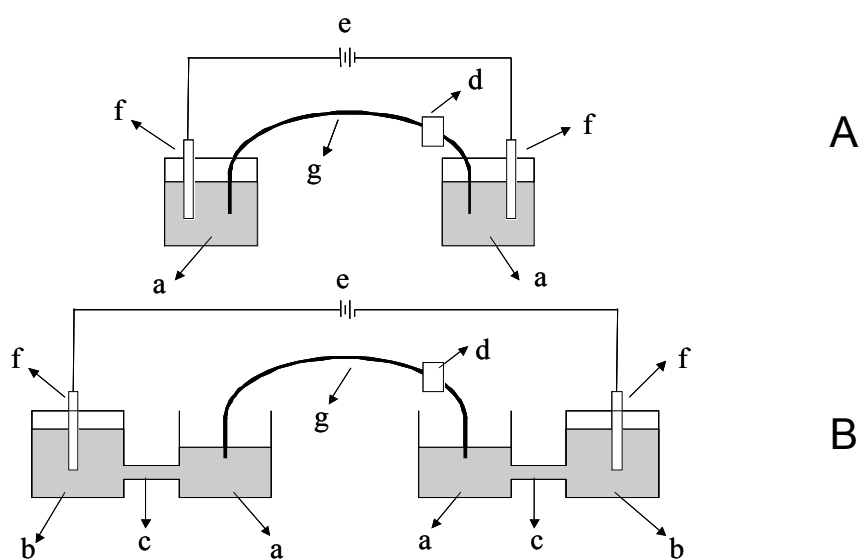


Figura 1. Esquema (A) de um equipamento de eletroforese capilar convencional e (B) do sistema de eletrólise separada: a - reservatórios principais contendo o capilar, b - reservatórios de eletrólise contendo os eletrodos de alta tensão, c - pontes salinas, d - detector, e - fonte de alta tensão, f - eletrodos, g - capilar.

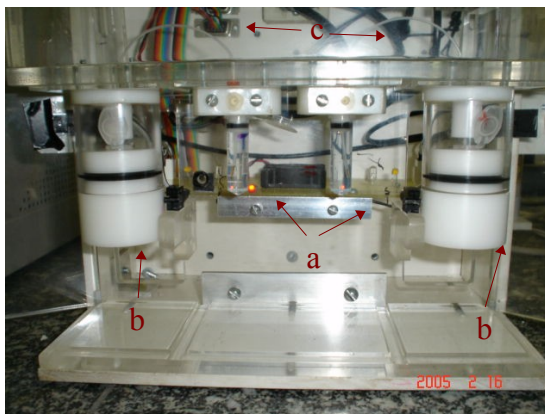


Figura 2. Foto do equipamento de eletroforese capilar contendo o sistema de eletrólise separada: a - reservatórios principais contendo o capilar, b - reservatórios de eletrólise contendo os eletrodos de alta tensão, c - pontes salinas.

Embora a complexidade de um equipamento de EC contendo o sistema de eletrólise separada seja maior em relação a um sistema convencional, ele minimiza a necessidade de trocas periódicas do eletrólito de corrida, além de permitir a utilização de eletrólitos sem capacidade tamponante. Dessa forma, a análise por EC de H_3O^+ e OH^- , espécies consumidas por tampões, passa a ser possível.

As vantagens da análise direta de íons hidrônio e hidroxila por eletroforese capilar consistem na possibilidade da determinação concomitante de demais espécies presentes na amostra, além das vantagens intrínsecas da técnica, como pequenos volumes de amostra necessários para a análise e de resíduos gerados. Além disso, a EC permite obter informações sobre algumas propriedades dessas espécies, como a determinação de sua mobilidade em condições específicas de temperatura, composição do meio e campo elétrico e o estudo do comportamento desses íons no interior do capilar, analisando a forma como essas espécies interagem com a sílica, entre outros. A obtenção da mobilidade do íon H_3O^+ , aliada a

estudos de simulação computacional, podem auxiliar na proposição de novos mecanismos de transporte de prótons em meio aquoso e não-aquoso.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em estudar o comportamento eletroforético dos íons hidrônio e hidroxila utilizando eletroforese capilar em zona em meio não tamponado e detecção condutométrica sem contato, visando avaliar a possibilidade de aplicação na determinação e quantificação destes íons, bem como na medida direta da mobilidade iônica destas espécies.

CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE ÍONS HIDRÔNIO

3.1. Introdução

Nesse capítulo, serão apresentados estudos teóricos e experimentais sobre o comportamento eletroforético do íon hidrônio (H_3O^+). A saber: (i) previsão teórica das distribuições de concentração dos íons H_3O^+ provenientes da dissociação de ácidos fracos nos instantes iniciais da separação eletroforética, através de simulações computacionais; (ii) estudo da migração dessa espécie considerando os efeitos da composição do eletrólito de corrida (pH, solvente utilizado) e da interação com a coluna capilar, bem como estratégias para minimização desse último; (iii) avaliação da possibilidade de quantificação da concentração total de íons H_3O^+ tituláveis em amostras de ácidos fortes, fracos e misturas e (iv) avaliação da determinação direta da mobilidade do íon hidrônio utilizando a eletroforese capilar em zona.

3.2. Experimental

3.2.1. Materiais e Métodos

Ácido acético (HAc) glacial, ácido orto-fosfórico 85% e ácido sulfúrico 95-97% foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido clorídrico 37%, ácido glutâmico (HGlu), ácido cítrico (HCit), ácido benzóico e cloridrato de histidina tiveram procedência Merck (Darmstad, Germany). Ácido oxálico foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Soluções estoque 50 mmol L⁻¹ de cada ácido foram padronizadas através de titulação potenciométrica, utilizando um pHmetro (Quimis, Q-400M1S, Diadema, SP, Brasil) com eletrodo de vidro combinado (Quimis, QA 338 – ECV, Diadema, SP) calibrado com tampões certificados de pH 4,0, 7,0 e 10,0 (Merck, Darmstad, Germany). Utilizou-se como titulante solução de NaOH, previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio seco em estufa a 120 °C. NaOH e hidrogenoftalato de potássio foram adquiridos da Merck (Darmstad, Germany).

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As soluções padrão e as amostras foram preparadas com água desionizada com resistividade maior ou igual a 18 MΩ (NANOpure UV, Barnsted, Dubuque, USA).

Trimetilclorosilano de grau analítico (Fluka, Suíça) e diclorodimetilsilano 98% (Merck, Germany) foram usados sem tratamento adicional.

Poliétilenoimina (PEI) foi obtido da Aldrich (Milwaukee, USA) e solução 10% (m/m) foi preparada diluindo-se em água desionizada.

3.2.2. Equipamento

Os experimentos foram realizados utilizando-se um equipamento de eletroforese capilar construído no próprio laboratório onde o trabalho foi desenvolvido (Figura 3). Este equipamento contém compartimentos adicionais para eletrólise separada [59] e detecção condutométrica sem contato (C⁴D) [53][55]. Todas as análises foram realizadas com o detector operando em 550 kHz e 2 Vpp. A temperatura no interior do equipamento foi mantida em aproximadamente 29 °C.

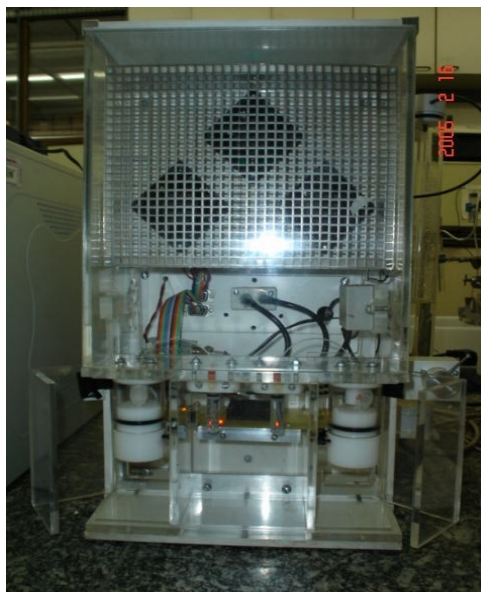


Figura 3. Equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato e sistema de eletrólise separada.

3.2.3. Condicionamento do capilar

Capilares de sílica fundida de 50 ou 75 μm d.i. e 360 μm d.e. (J&W Scientific, Folson, USA) foram condicionados antes de cada ciclo de análise com fluxo constante de solução de NaOH 0,1 mmol L^{-1} por 15 min, seguido por água desionizada e eletrólito de corrida, pelo mesmo período cada. Finalmente, era aplicado campo elétrico até estabilização da linha base.

Capilares de Teflon de 50 μm d.i. (Cole-Parmer, USA) foram condicionados somente com fluxo constante do eletrólito de corrida por 15 min, seguido de aplicação do potencial de corrida até estabilização da linha base.

3.3. Resultados e Discussões

O sistema de eletrólise separada foi o recurso que possibilitou a análise direta dos íons hidrônios por eletroforese capilar em zona. Dessa forma, soluções não-tamponadas puderam ser utilizadas como eletrólitos de corrida, sem sofrer os efeitos da eletrólise.

O eletroferograma da separação do íon hidrônio e de alguns metais alcalinos e alcalinos terrosos é mostrado na figura 4. Nesse eletroferograma, o tempo de migração do EOF foi de 18 minutos. É importante destacar que a alta mobilidade do íon H_3O^+ implica em boa resolução entre seu pico e o de qualquer outro cátion.

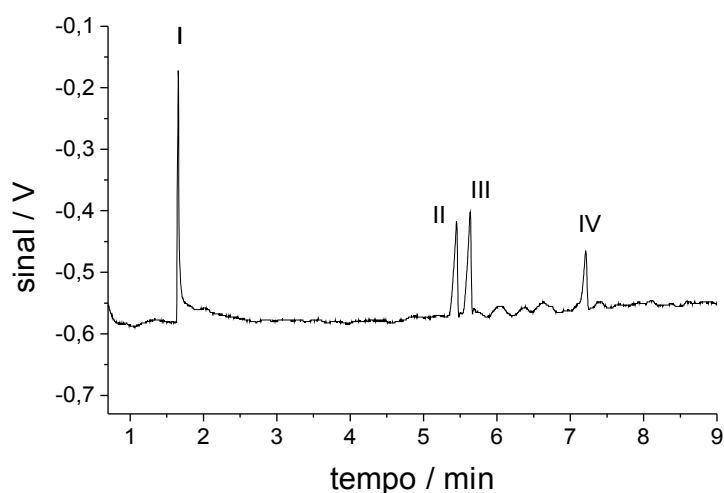


Figura 4. Eletroferograma de solução contendo mistura de HCl $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, Cs_2SO_4 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, KCl $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, e NaCl $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito de corrida: solução de LiCl 10 mmol L^{-1} . Capilar: sílica fundida, $75 \mu\text{m}$ d.i. x $67,2 \text{ cm}$ comprimento total ($55,2 \text{ cm}$ até o detector). Potencial de corrida: 10 kV . Injeção: hidrodinâmica (10 s , $10 \text{ cmH}_2\text{O}$). Picos: (I) H_3O^+ , (II) Cs^+ , (III) K^+ e (IV) Na^+ .

3.3.1. Efeito do pH na análise de íons H_3O^+ - Simulações computacionais

Prever o comportamento eletroforético de uma espécie nem sempre é tarefa simples. No caso do H_3O^+ , sua mobilidade será diretamente dependente do pH do meio em que ele se encontra. Entretanto, o pH ao longo do capilar não é uniforme, vez que depende não só da composição do eletrólito de corrida, como da própria amostra injetada. A não-homogeneidade do pH ao longo do capilar afeta a dissociação de ácidos fracos, alterando a densidade de carga local. Através da ação do campo elétrico, essa zona migrará, afetando o pH de outras regiões do capilar e assim sucessivamente, em toda a sua extensão. Dessa forma, é difícil prever as distribuições dessa espécie ao longo da coluna. Assim, decidiu-se recorrer a simulações computacionais para tentar compreender o comportamento do H_3O^+ decorrente da injeção de um ácido fraco durante uma corrida eletroforética. Esta etapa do projeto contou com a colaboração do Dr. José Geraldo Alves Brito-Neto².

Nessas simulações, foi adicionada uma etapa de cálculo de equilíbrio após cada iteração da parte de transporte. O cálculo de equilíbrio foi realizado utilizando o algoritmo SEQEx2 [60]. A integração temporal da parte de transporte foi feita através do método de Runge-Kutta de quarta ordem com controle adaptativo do tamanho do passo de tempo de modo a manter uma estimativa do erro de discretização dentro de certos limites [61]. O cálculo de equilíbrio químico envolveu a resolução numérica de um sistema de equações algébricas pelo método de Newton-Raphson para cada nó da coluna. O programa foi escrito em C++.

Nesse estudo, foram considerados três ácidos fracos hipotéticos com valores de pK_a iguais a 3, 7 e 10. Os eletrólitos de corrida tiveram seu pH variando de 3 a 12

² Endereço atual: Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan.

e continham apenas os íons H^+ , OH^- , Na^+ e Cl^- . As composições utilizadas foram calculadas de modo que a força iônica fosse sempre aproximadamente igual a 20 mmol L^{-1} . As composições das soluções ácidas foram obtidas considerando a neutralização parcial da solução de pH 2 (HCl 10 mmol L^{-1}) com $NaOH$. Para as soluções básicas, considerou-se a neutralização parcial da solução de pH 12 ($NaOH$ 10 mmol L^{-1}) com HCl . O campo elétrico médio considerado ao longo da coluna era 250 V cm^{-1} .

Na configuração inicial de simulação, o analito ocupava um *plug* retangular de comprimento igual a 2 mm. A concentração total do ácido em questão era sempre 1 mmol L^{-1} na solução injetada e o mesmo se encontrava dissolvido no eletrólito de corrida. O *plug* inicial com o analito foi colocado deliberadamente no centro da coluna para que se pudesse ver a evolução das distribuições de concentração tanto das espécies catiônicas, quanto das aniônicas.

A figura 5 contém as distribuições das concentrações de H_3O^+ em função do tempo referente a um *plug* inicial de mesma largura e mesma concentração de um ácido fraco monoprótico hipotético de $pK_a = 3$. Para eletrólitos com valores de pH entre 3 e 7, a altura do pico referente ao H_3O^+ mantém-se praticamente constante durante a corrida e possui mobilidade próxima à prevista para este íon. Já para eletrólitos com pH superior a 7, a borda do pico começa a ficar achatada, indicando neutralização parcial do H_3O^+ pelos íons OH^- presentes no eletrólito de corrida que migram na direção oposta. A partir de pH 10, todo o H_3O^+ injetado é neutralizado antes mesmo de 2 s de corrida. Em pH 11, observa-se um pequeno pico, referente à vacância do H_3O^+ , se deslocando contra o campo elétrico. Em eletrólito de pH 12 observa-se apenas uma ligeira perturbação de concentração na região do *plug* injetado. Além disso, nos eletrólitos de pH 3 e 4, a injeção da amostra provoca

perturbações na concentração do eletrólito de corrida na região do *plug* injetado, gerando uma marca, com mobilidade efetiva nula, que irá influenciar no perfil do pico do EOF. Destaca-se que, para se obter melhor visualização dos gráficos, foram utilizadas escalas diferentes em cada um dos eixos das coordenadas.

É importante salientar que essas simulações foram efetuadas desprezando-se o efeito que os grupos silanóis do capilar de sílica poderiam exercer sobre o analito. A dificuldade de se inserir este parâmetro na simulação decorreu do conhecimento impreciso do comportamento da sílica utilizada na confecção da coluna. Posteriormente, será mostrado como essa interação afeta os perfis de concentração do H_3O^+ .

A figura 6 contém resultados para um experimento semelhante, porém para um ácido hipotético de $pK_a = 7$. Para eletrólitos ácidos, à medida que o pH aumenta, a altura do pico referente ao *plug* inicial também aumenta, devido à maior dissociação do ácido em soluções com pHs mais altos. Em eletrólitos neutros ou próximos da neutralidade ($6 \leq pH \leq 8$), o pico do H_3O^+ torna-se mais largo que o do *plug* de injeção, porém possui altura semelhante. Para valores de pH mais altos, os resultados são semelhantes aos obtidos para o ácido de $pK_a = 3$.

A figura 7 contém os resultados para o mesmo experimento, porém com um ácido hipotético de $pK_a = 10$. As distribuições de concentrações obtidas foram semelhantes às observadas para o ácido de $pK_a = 7$. No entanto, como nesse caso a concentração de H_3O^+ dissociado é menor, já não é mais possível observar o H_3O^+ migrando a partir de pH 8.

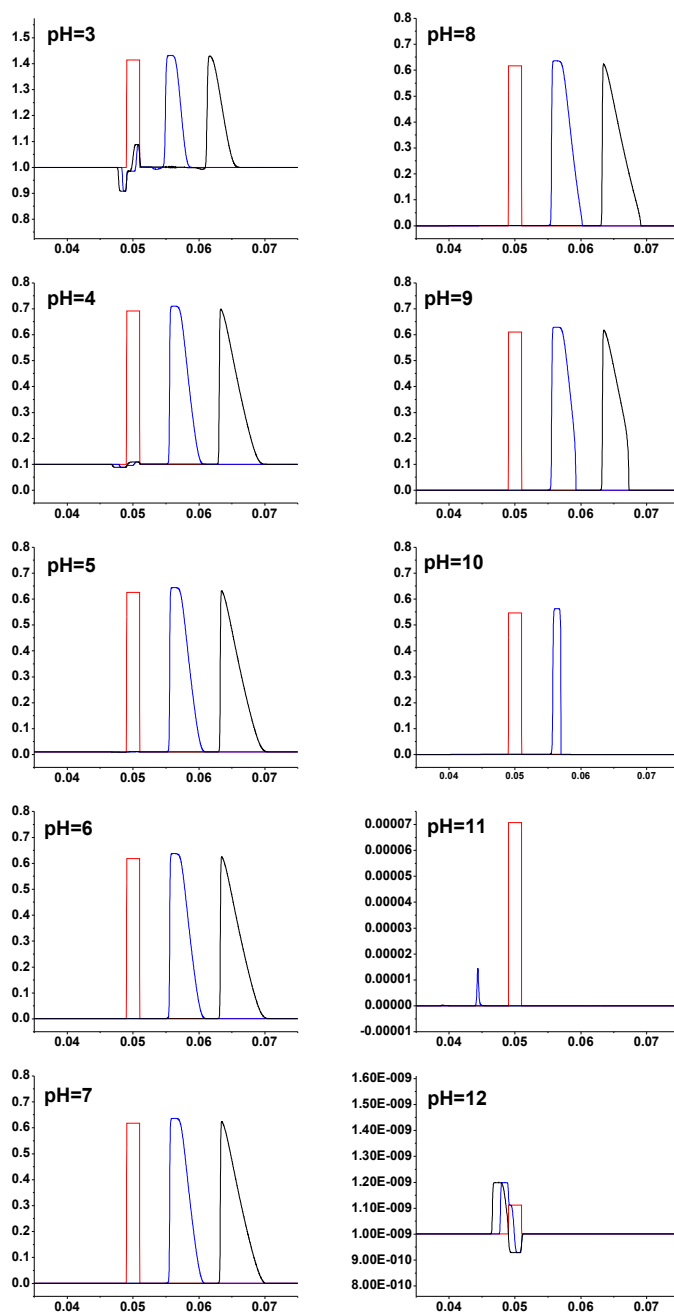


Figura 5. Distribuição de concentrações de H_3O^+ ao longo do capilar em função do tempo para um *plug* inicial de concentração 1 mmol L^{-1} de um ácido de $\text{pK}_a = 3$ em eletrólitos de corrida de diferentes pHs. Em vermelho, distribuição inicial, em azul, após 1 s e em preto, após 2 s. Eixo x: posição em metros, eixo y: concentração em mmol L^{-1} .

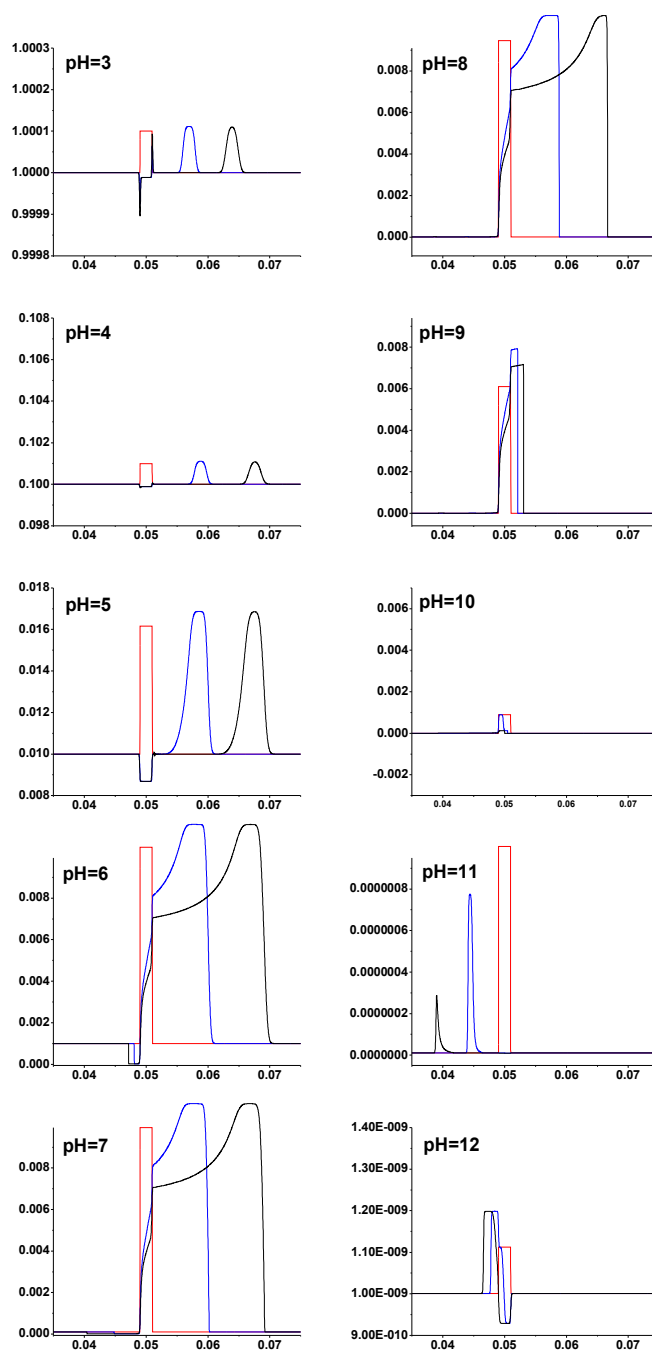


Figura 6. Distribuição de concentrações de H_3O^+ ao longo do capilar em função do tempo para um *plug* inicial de concentração 1 mmol L^{-1} de um ácido de $\text{pK}_a = 7$ em eletrólitos de corrida de diferentes pHs. Em vermelho, distribuição inicial, em azul, após 1 s e em preto, após 2 s. Eixo x: posição em metros, eixo y: concentração em mmol L^{-1} .

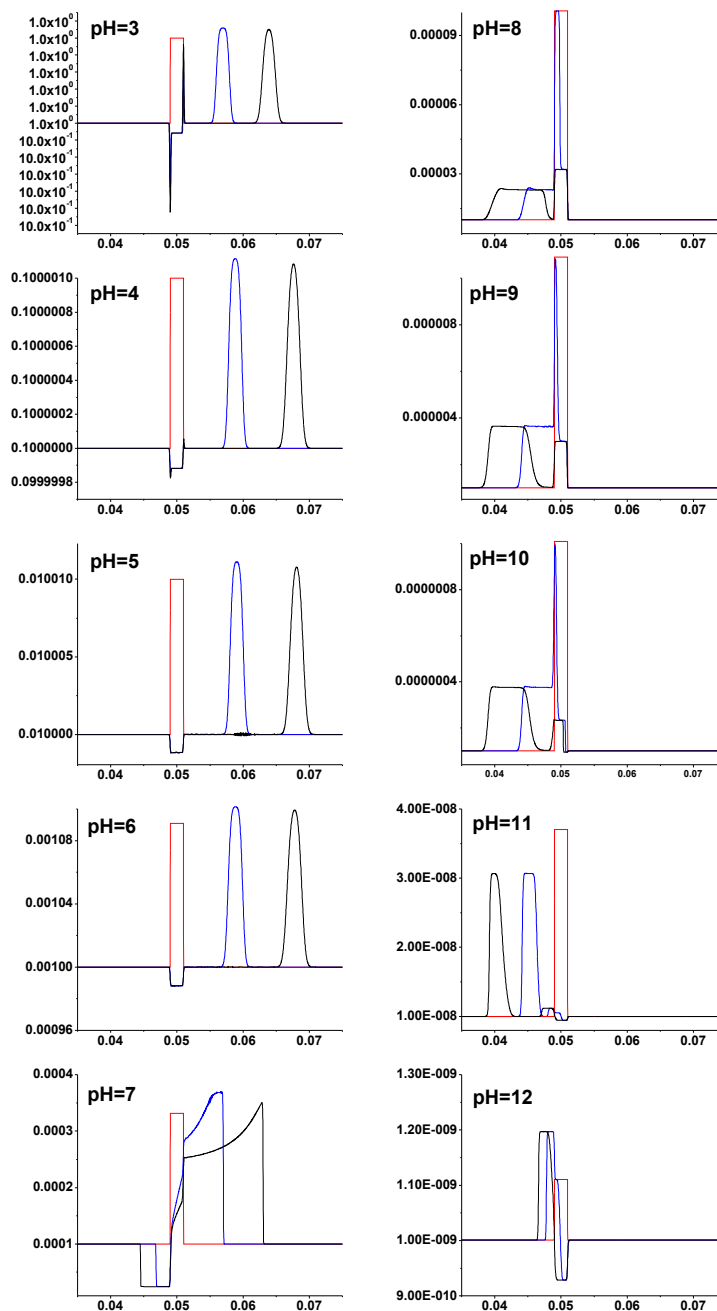


Figura 7. Distribuição de concentrações de H_3O^+ ao longo do capilar em função do tempo para um *plug* inicial de concentração 1 mmol L^{-1} de um ácido de $\text{pK}_a = 10$ em eletrólitos de corrida de diferentes pHs. Em vermelho, distribuição inicial, em azul, após 1 s e em preto, após 2 s. Eixo x: posição em metros, eixo y: concentração em mmol L^{-1} .

3.3.2. Interação do H_3O^+ com a coluna capilar

Devido ao caráter negativo que os grupos silanóis conferem ao capilar de sílica (quando em contato com soluções de pH tipicamente > 2), espécies catiônicas podem interagir com a superfície interna do capilar através de atrações eletrostáticas ou interações químicas. Dependendo da intensidade da retenção dessas espécies pela coluna, podem surgir picos com formatos de caudas ou mesmo o total desaparecimento do sinal referente àquela espécie nos eletroferogramas registrados.

A figura 8 mostra eletroferogramas obtidos experimentalmente de um ácido forte (ácido clorídrico: $pK_a = -7,0$) e dois ácidos fracos com constantes de dissociação distintos (ácido acético: $pK_a = 4,75$; ácido benzóico: $pK_a = 4,20$), utilizando solução de NaCl 10 mmol L^{-1} (pH 6) como eletrólito de corrida. Observa-se neles, em maior ou menor grau, uma subida brusca na fronteira do sinal do H_3O^+ , seguida de uma cauda na parte posterior do pico. Comparando-se esses resultados experimentais com os obtidos através de simulação (figura 5, pH 6, por exemplo), ocorre inversão no perfil dos sinais, já que no segundo, a subida ocorre suavemente, seguida de uma queda muito brusca.

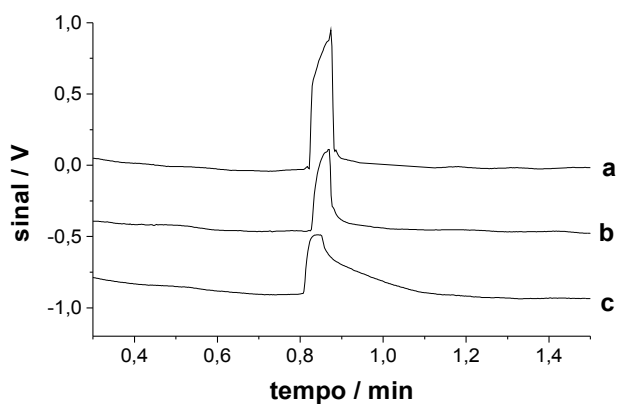


Figura 8. Eletroferogramas de soluções de ácidos (a) clorídrico, (b) benzóico e (c) acético, cada uma 1 mmol L^{-1} . Eletrólito de corrida: solução de NaCl 10 mmol L^{-1} . Potencial de corrida: 10 kV. Capilar: sílica fundida, $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i. x 50 cm de comprimento total (38 cm até o detector). Injeção: hidrodinâmica (10 s, $10 \text{ cmH}_2\text{O}$).

Apesar de, num primeiro momento, as curvas obtidas por simulação e experimentalmente parecerem ter perfis semelhantes, deve-se estar atento ao fato dos gráficos obtidos pelas simulações terem domínio no espaço, enquanto que os obtidos experimentalmente estão em função do tempo.

Uma vez que, nas simulações computacionais, não foi considerado nenhum tipo de influência por parte dos grupos silanóis do capilar, essa inversão no perfil dos sinais sugere interação do H_3O^+ na parede do capilar de sílica, gerando picos com caudas. O fato de ácidos fracos possuírem caudas mais acentuadas que ácidos fortes sugere que a interação do H_3O^+ provoque aumento gradual da dissociação do ácido no decorrer da corrida, resultando em um sinal bastante assimétrico. Além disso, a intensidade em que o fenômeno ocorre pode estar relacionada também ao condicionamento do capilar, no qual maior ou menor quantidade de grupos silanóis

desprotonados poderia afetar o grau de interação do íon hidrônio.

Outro fator ao qual pode ser atribuída a inversão no perfil do pico do H_3O^+ nos eletroferogramas obtidos experimentalmente e através de simulações é o tipo de detecção. No caso das simulações, somente eram consideradas as distribuições nas concentrações de H_3O^+ ao longo da coluna, desprezando-se a contribuição do eletrólito de corrida. Já a detecção condutométrica considera também a influência do eletrólito de corrida, dado que são registradas as diferenças de condutividade do analito em relação à do eletrólito.

A figura 9 contém eletroferogramas da injeção de solução de HCl 1 mmol L^{-1} , realizados com eletrólitos de corrida de diferentes pHs, utilizando capilares de sílica fundida de dois diâmetros distintos. Os eletrólitos de corrida foram preparados a partir de uma solução de NaCl 10 mmol L^{-1} e adicionando-se solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até atingir o pH desejado.

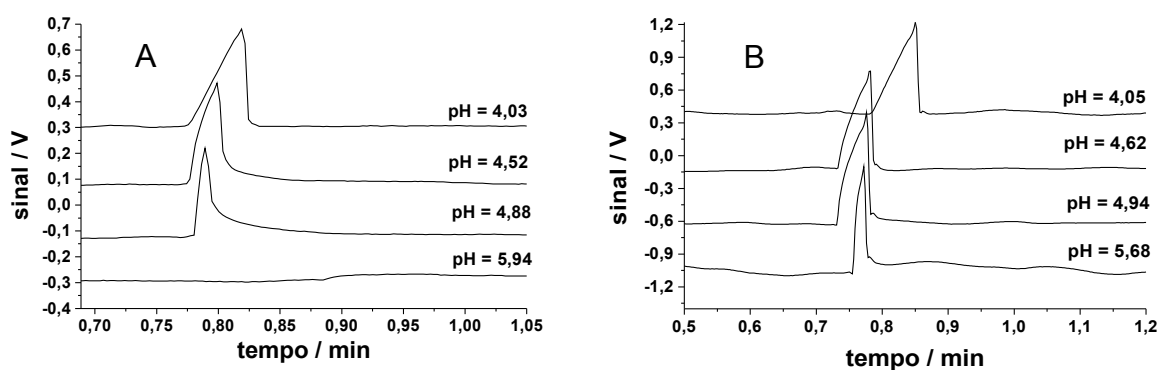


Figura 9. Eletroferogramas de solução de HCl 1 mmol L^{-1} , utilizando como eletrólito de corrida solução de NaCl 10 mmol L^{-1} em diversos pHs. Capilar: (A) $50 \mu\text{m}$ d.i. x $59,7 \text{ cm}$ comprimento total ($46,9 \text{ cm}$ até o detector) e (B) $75 \mu\text{m}$ d.i. x $57,0 \text{ cm}$ comprimento total ($44,4 \text{ cm}$ até o detector). Potencial de corrida: 15 kV . Injeção: hidrodinâmica (10 s , $10 \text{ cmH}_2\text{O}$).

Comparando as figuras 9A e 9B é possível observar que quanto menor o diâmetro interno do capilar, mais significativa se torna a influência dos grupos silanóis sobre o H_3O^+ injetado. Assim, no eletrólito de corrida com pH 5,94, por exemplo, praticamente não se observa sinal referente ao H_3O^+ num capilar de 50 μm , enquanto que num capilar de 75 μm , em pH 5,68, o sinal é de grande intensidade. Além disso, é possível observar o perfil de cauda mais pronunciado no capilar de menor diâmetro, indicando a interação do analito com os grupos silanóis. A relação entre a área superficial pelo volume interno do capilar é 50% maior num capilar de 50 μm , quando comparada a de um de 75 μm , daí decorrendo a grande influência do diâmetro do capilar na interação dos íons hidrônio.

Na medida em que o pH do eletrólito de corrida decresce, maior a protonação dos grupos silanóis, diminuindo a interação com os íons H_3O^+ , resultando no desaparecimento das caudas dos picos. Essa grande interação do íon hidrônio com o capilar decorre das fortes ligações de hidrogênio que surgem entre os grupos silanóis desprotonados e o íon H_3O^+ .

O formato do pico do H_3O^+ inclinado para a direita pode ser atribuído à grande diferença na condutividade do íon H_3O^+ em relação ao eletrólito de corrida, causando o fenômeno da eletrodispersão. A figura 10 ilustra como ocorre esse fenômeno. No caso da análise do íon hidrônio, esse fenômeno é mais acentuado quando se empregam eletrólitos de corrida mais ácidos, pois nesse caso a interação do analito com a coluna é menor, ressaltando os efeitos da eletrodispersão.

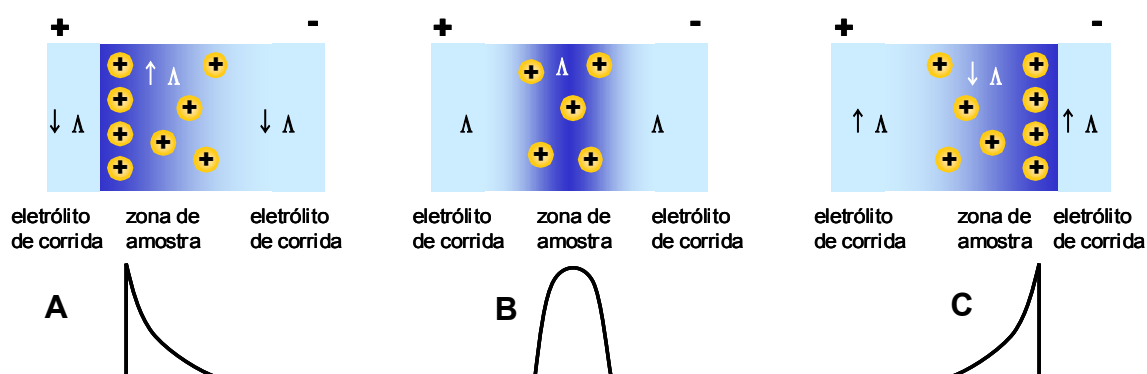


Figura 10. Eletrodispersão devido a diferenças na condutividade da amostra e do eletrólito de corrida. Δ refere-se à condutividade da solução. Os sinais abaixo das representações dos interior dos capilares são os perfis de concentração das espécies esperados em cada caso. (A) Condutividade da amostra é maior que do eletrólito de corrida, (B) eletrólito de corrida e amostra possuem condutividades semelhantes e (C) condutividade da amostra é menor que do eletrólito de corrida.

Essas distorções de picos são causadas por diferenças na condutividade, e conseqüentemente, no campo elétrico, em cada zona. Quando a amostra possui maior mobilidade (ou seja, maior condutividade e menor resistência) que o eletrólito de corrida, sua região frontal, que se difunde na direção de migração, encontra um potencial mais alto quando entra na região do eletrólito. Essas espécies são, então aceleradas, gerando um perfil de concentração semelhante ao observado na figura 10A. Por outro lado, quando as espécies da região traseira da amostra se difunde para o eletrólito, encontrando uma zona de campo elétrico mais elevado, elas são aceleradas perfilando a zona de amostra, formando um perfil de concentração achatado. O efeito inverso é observado quando a condutividade da amostra é menor que do eletrólito de corrida (figura 10C). Quando a zona de amostra e o eletrólito de corrida possuem condutividades semelhantes, a eletrodispersão não ocorre (figura 10B).

Apesar de sua natureza inerte, capilares de Teflon também apresentaram interação com o H_3O^+ injetado (figura 11). Isto ocorre porque, embora a composição no seio do polímero seja politetrafluoretileno, a superfície contém grupos iônicos gerados durante a polimerização ou por ação química posterior.

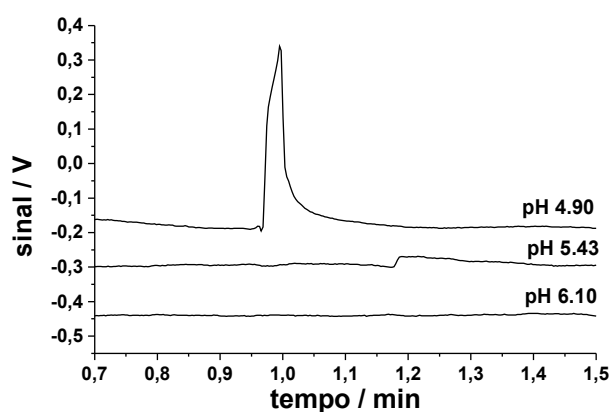


Figura 11. Eletroferogramas de solução de HCl 1 mmol L^{-1} , utilizando como eletrólito de corrida solução de NaCl 10 mmol L^{-1} em diversos pHs, em capilar de Teflon. Capilar: $50 \mu\text{m}$ d.i., $53,5 \text{ cm}$ comprimento total ($41,5 \text{ cm}$ até o detector). Potencial de corrida: 11 kV . Injeção hidrodinâmica (10 s , $10 \text{ cmH}_2\text{O}$).

3.3.3. Modificação do capilar

A modificação da superfície interna do capilar, em geral, visa a redução ou eliminação da interação dos analitos com a coluna ou alterações do EOF com o intuito de melhorar a resolução entre picos de difícil separação [39]. Dentre as várias estratégias utilizadas, foram realizadas, nesse trabalho, duas tentativas: (I) silanização e (II) recobrimento com polietilenoimina (PEI). A silanização consiste na reação dos grupos silanóis do capilar com reagentes silanizantes, em geral

clorossilanos, com o intuito de ancorar grupos hidrofóbicos à superfície interna. A figura 12 ilustra a reação dos grupos silanóis com o trimetilclorossilano.

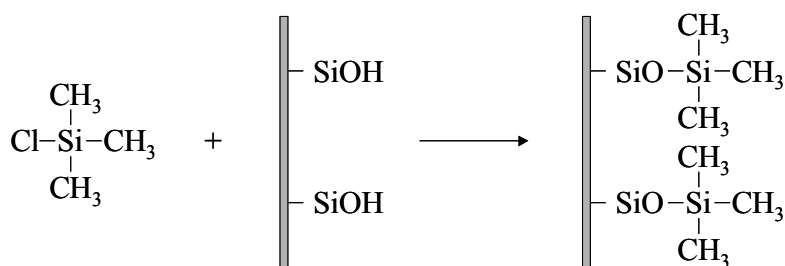


Figura 12. Esquema da reação de silanização do capilar com trimetilclorossilano.

A utilização de PEI como modificador de superfície foi introduzida por Towns e Regnier [62] e aplicada na separação de proteínas. Nesse caso, não ocorre reação química, mas somente uma interação de natureza eletrostática entre os grupos silanóis e o polímero, conforme pode-se observar na figura 13 abaixo.

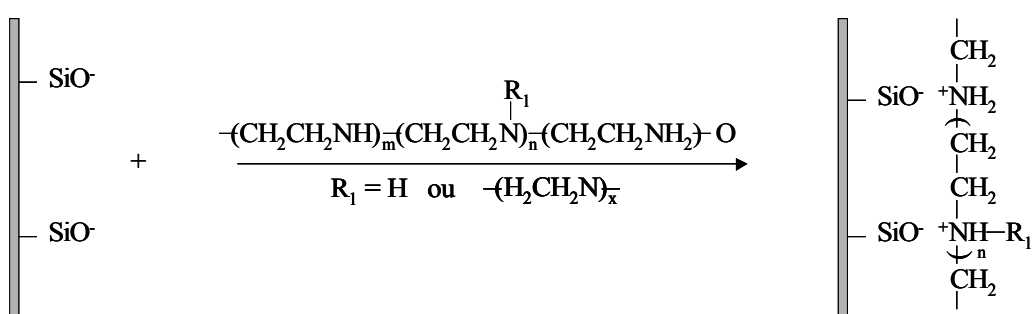


Figura 13. Interação da polietilenoimina (PEI) com o capilar de sílica.

Os procedimentos experimentais e as discussões sobre os resultados seguem na seqüência.

I) Silanização do capilar

Procedimento Experimental

Foram realizados dois procedimentos de silanização do capilar utilizando: (i) clorotrimetilsilano e (ii) diclorodimetilsilano seguido de tratamento com clorotrimetilsilano.

Nesta etapa do trabalho, foi utilizado capilar de sílica de 75 μm de diâmetro interno, previamente lavado com (1) solução de NaOH 0,1 mmol L⁻¹, (2) solução de HCl 0,1 mmol L⁻¹ e (3) água. Cada ciclo teve duração de 15 minutos. Após esta etapa, o capilar foi levado à estufa a 120 °C para secagem. Em seguida, uma das extremidades do capilar foi conectada a um sistema fechado contendo o reagente silanizante. A passagem do reagente pelo interior do capilar foi forçada através do aumento de pressão causado pela propulsão do ar utilizando uma bomba de aquário (Betta Silente, Angel-Brasil). Essa etapa teve duração de 30 minutos. Finalmente, o capilar foi novamente levado à estufa à 120 °C para finalizar o processo.

No caso da silanização com o diclorodimetilsilano, após a primeira etapa acima descrita, sucedeu-se uma segunda de silanização com clorotrimetilsilano. Esta etapa seguiu os mesmos passos que a primeira, excetuando-se a lavagem, e teve como finalidade eliminar os grupos ativos restantes da primeira silanização.

Resultados e Discussão

Em ambos os casos, tanto na silanização com clorotrimetilsilano ou com diclorodimetilsilano, devido à redução significativa do fluxo eletrosmótico, a linha base se tornou bastante instável, inviabilizando qualquer tipo de análise. Ainda, os grupos ancorados se tornaram bastante suscetíveis a hidrólise, causando problemas

de repetibilidade e aumento significativo no tempo do EOF a cada corrida.

II) Recobrimento do capilar com PEI

Procedimento Experimental

O capilar utilizado foi o de sílica de 50 μm de diâmetro interno, previamente lavado com (1) solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 30 min e (2) água por 15 min. Em seguida, solução de PEI 10% (m/m) foi introduzida no capilar através de diferença de pressão, com fluxo constante por 30 min e o polímero foi mantido no interior do capilar por 12 horas. Em seguida, o excesso de polímero foi retirado através de fluxo de ar, o capilar foi lavado por 30 min com água desionizada e, finalmente, preenchido com o eletrólito de corrida.

Resultados e Discussão

Capilares revestidos com PEI são utilizados principalmente na análise de proteínas catiônicas, uma vez que esse polímero confere carga positiva à parede interna do capilar, repelindo espécies com carga positiva [63]. No entanto, os resultados da análise de íons H₃O⁺ utilizando a PEI como camada de revestimento do capilar não foram animadores. De forma semelhante à análise com capilar sem revestimento, não foi possível observar o sinal do H₃O⁺ ao se injetar uma amostra de HCl 1 mmol L⁻¹, utilizando-se como eletrólito solução de NaCl 10 mmol L⁻¹ (pH 6) e capilar de 50 μm d.i. . Esses resultados sugerem protonação apenas parcial dos grupos aminos do polímero no pH em questão.

3.3.4. Análise de H_3O^+ em meio não aquoso

Os solventes orgânicos em eletroforese capilar podem ser utilizados apenas como aditivos ou podem substituir completamente a água. A eletroforese em meio não-aquoso – NACE (*Non-aqueous capillary electrophoresis*) visa, em geral, um aumento de seletividade [64], além de proporcionar um meio mais compatível para a análise de compostos hidrofóbicos [65]. É importante mencionar também a redução da condutividade do eletrólito de corrida e, conseqüentemente, do efeito Joule, possibilitando a aplicação de potenciais de corrida mais elevados.

A substituição da água por outro tipo de solvente implica em modificações nas propriedades ácido-base das espécies, tanto dos analitos quanto da sílica do capilar. Esta última causa modificações do EOF [65].

A figura 14 mostra um eletroferograma de solução contendo HCl e LiCl utilizando DMSO como o solvente do eletrólito de corrida.

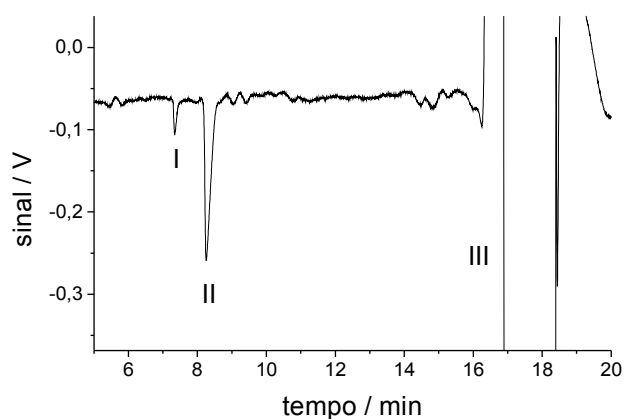


Figura 14. Eletroferograma de solução contendo HCl 2 mmol L^{-1} e LiCl 2 mmol L^{-1} em DMSO, utilizando como eletrólito de corrida solução de KNO_3 10 mmol L^{-1} em DMSO. Capilar: $75 \mu\text{m}$ d.i. x $58,8 \text{ cm}$ comprimento total ($46,8 \text{ cm}$ até o detector). Potencial de corrida: 26 kV . Injeção: hidrodinâmica (20 s , $10 \text{ cmH}_2\text{O}$). Picos: (I) H_3O^+ , (II) Li^+ e (III) EOF.

A substituição da água por um solvente orgânico resultou em um sinal do H_3O^+ mais simétrico devido à menor dissociação dos grupos silanóis da superfície do capilar nesse meio, causando diminuição da interação do analito com a coluna. A redução significativa do EOF, quando comparado a uma análise em um meio aquoso, é outro indício de que os grupos silanóis estão mais protonados nesse caso. Também observa-se um aumento significativo no tempo de migração do H_3O^+ , quando comparado a uma corrida utilizando um eletrólito de corrida aquoso, e o registro de um sinal negativo referente ao H_3O^+ . Esse fato deve-se à diminuição da mobilidade do íon hidrônio em meio orgânico, adquirindo mobilidade menor que do K^+ (em meio aquoso, utilizando KCl como eletrólito de corrida, o sinal do H_3O^+ é registrado como um pico positivo).

3.3.5. Picos de sistema

Com o objetivo de verificar a presença de picos de sistema na análise dos íons hidrônio, foram registrados diversos eletroferogramas utilizando como eletrólito de corrida soluções de NaCl 10 mmol L^{-1} em diferentes pHs e injetando-se apenas água desionizada. As soluções utilizadas como eletrólito de corrida foram preparadas a partir de uma solução 10 mmol L^{-1} de NaCl e adicionando-se HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até atingir o pH desejado. Os resultados mostrados nos eletroferogramas da figura 15 mostram que a partir de pH 4,5 começam a surgir picos de sistema com mobilidade próxima a do H_3O^+ , inviabilizando sua análise em pHs iguais ou menores a esse valor.

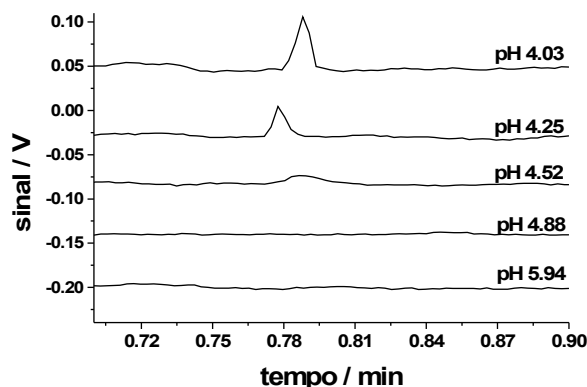


Figura 15. Picos de sistema em soluções de NaCl 10 mmol L^{-1} em diferentes pHs como eletrólito de corrida. Capilar: sílica fundida de $50 \mu\text{m}$ d.i. x $59,7 \text{ cm}$ comprimento total ($46,9 \text{ cm}$ até o detector). Potencial de corrida: 15 kV . Amostra injetada: água desionizada, injeção hidrodinâmica (10 s , $10 \text{ cmH}_2\text{O}$).

3.3.6. Quantificação

O emprego da EC na quantificação de H_3O^+ possui algumas vantagens frente às técnicas clássicas de análise, como o baixo volume de resíduos gerados e a pequena quantidade de amostra injetada. Além disso, a EC, ao contrário da potenciometria e da titulação, possibilita a determinação simultânea de outras espécies. No entanto, realizar esse tipo de análise por eletroforese capilar implica em perdas consideráveis no que diz respeito a exatidão e precisão, pois i) a obtenção de uma curva analítica se faz obrigatoriamente necessária e ii) é necessária a padronização prévia da solução estoque utilizada na obtenção da curva analítica.

No que diz respeito à EC, alguns ácidos fortes e fracos, bem como mistura destes, foram avaliados quanto a linearidade da curva analítica, limites de detecção e quantificação instrumental do método.

As soluções estoque das amostras ácidas foram padronizadas por titulação potenciométrica com solução de hidróxido de sódio previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio. Posteriormente, as soluções padrões foram preparadas diluindo-se os estoques em solução de NaCl, cuja concentração final era de 10 mmol L⁻¹. Os padrões foram preparados em meio contendo NaCl na tentativa de compatibilizar a condutividade da amostra com a do eletrólito de corrida e minimizar distorções no formato de pico.

As corridas foram feitas utilizando-se capilar de sílica fundida de 75 µm d.i. com 50 cm de comprimento total (38 cm até o detector). O potencial de corrida aplicado foi de 10 kV. O eletrólito de corrida foi preparado diluindo-se NaCl em água desionizada previamente aquecida à ebulição (para retirada de CO₂ dissolvido), em concentração de 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0).

A integração numérica dos picos registrados nos eletroferogramas foi feita com o programa FityK 0.7.4 [66].

As curvas analíticas para os ácidos clorídrico e acético, figuras 16 e 17 respectivamente, mostraram uma faixa de resposta linear da ordem de dezenas ou centenas de µmol L⁻¹ a dezenas de mmol L⁻¹, com coeficiente de correlação maior que 0,998 numa escala di-log. Os parâmetros da regressão linear de outros ácidos estudados encontram-se na tabela 1.

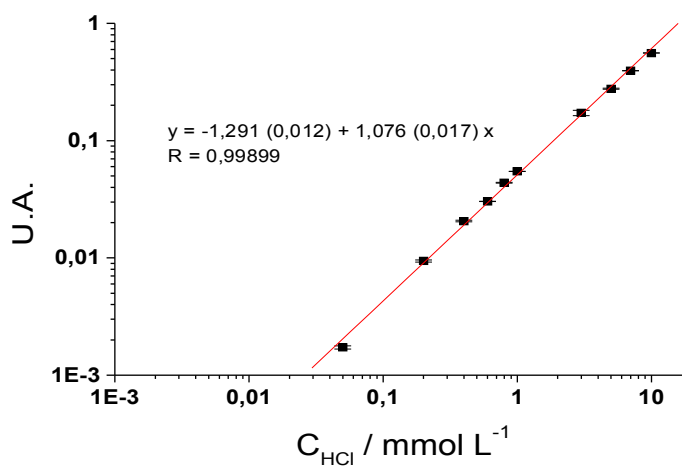


Figura 16. Curva analítica de padrões de ácido clorídrico. Concentrações de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 10mmol L^{-1} do composto. Média e desvio padrão de duplicatas.

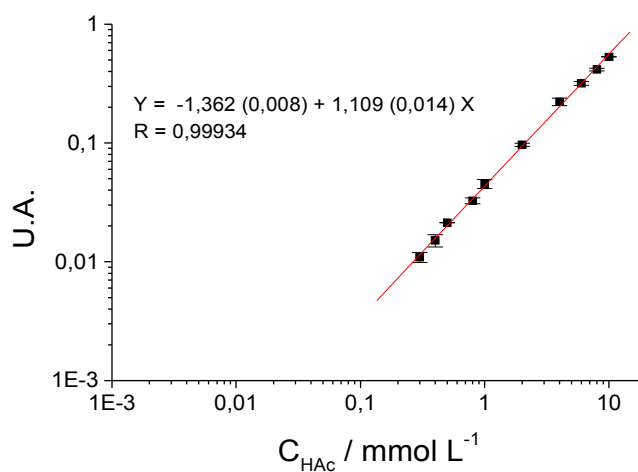


Figura 17. Curva analítica de padrões de ácido acético. Concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 10mmol L^{-1} do composto. Média e desvio padrão de duplicatas.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados a partir dos parâmetros da curva analítica (Equações 2 e 3), onde s é a estimativa do desvio padrão do sinal analítico do branco e B é a inclinação da curva analítica.

$$LD = 3,3 \frac{s}{B} \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{B} \quad \text{Eq. 3}$$

Tabela 1. Parâmetros da regressão linear da curva de quantificação de vários ácidos.

Ácido	A	B	R	N	Conc / mmolL ⁻¹	LD / mmolL ⁻¹	LQ / mmolL ⁻¹
Clorídrico	-1,291 (0,012)	1,076 (0,017)	0,99899	10	0,05 - 10	0,005	0,015
Acético	-1,362 (0,008)	1,109 (0,014)	0,99934	10	0,1 - 10	0,007	0,021
Oxálico	-1,01 (0,02)	1,05 (0,03)	0,99793	6	0,1 - 8	0,020	0,060
Sufúrico	-1,038 (0,016)	1,11 (0,02)	0,99871	7	0,1 - 8	0,021	0,063
Fosfórico	-1,416 (0,009)	1,146 (0,15)	0,99951	8	0,2 - 9	0,037	0,111
Benzóico	-1,351 (0,007)	1,027 (0,014)	0,99936	9	0,3 - 8	0,064	0,192
Clorídrico + Acético (1:1 v/v)	-1,359 (0,006)	1,075 (0,009)	0,99987	6	0,1 - 10	0,065	0,195

A e B são os coeficientes (com seus respectivos erros entre parênteses) da equação

$Y = A + Bc$ onde Y e c referem-se aos valores de área do pico do H_3O^+ , obtidos a partir do eletroferograma, e concentração analítica da amostra, respectivamente. R - coeficiente de correlação linear. N - número de pontos. $Conc$ - faixa de concentração considerada na curva analítica. LD e LQ - limites de detecção e quantificação, respectivamente.

Os resultados da tabela 1 mostram a possibilidade de quantificação tanto de ácidos fortes quanto fracos, bem como de suas misturas. Entretanto, existe uma

limitação em relação aos ácidos fracos, no qual não é possível analisar ácidos com pK_a maiores que o pH do eletrólito de corrida. Esse assunto será melhor abordado na seção 3.3.8 deste capítulo.

Analisando-se a faixa de resposta linear do método proposto e comparando-se com a titulação ácido-base, ambas possuem valores comparáveis, na faixa de concentração da ordem de mmol L^{-1} .

3.3.7. Determinação do número de hidrogênios tituláveis

Nas análises por eletroforese capilar, quando o eletrólito de corrida é um tampão, a injeção de amostras ácidas ou básicas provoca o deslocamento dos equilíbrios ácido-base no eletrólito de corrida de tal forma que a concentração hidrogeniônica na solução permaneça praticamente inalterada. Nesse caso, o sinal referente ao íon H_3O^+ é inexistente ou pode-se observar apenas um deslocamento da linha base. Em decorrência desse fenômeno, a análise de ácidos é feita, em geral, através da determinação de seus ânions conjugados. Assim, na injeção de ácidos fracos, a mobilidade efetiva da base conjugada é determinada pela fração de íons dissociados naquele determinado pH. A mobilidade efetiva do ânion conjugado pode, então, ser estimada através da equação 4, onde α_j e μ_j são o coeficiente de dissociação do ácido e a mobilidade da base conjugada j , respectivamente.

$$\mu_{ef} = \sum \alpha_j \mu_j \quad \text{Eq. 4}$$

Por outro lado, quando o mesmo ácido fraco é injetado em um eletrólito de corrida que não possui características tamponantes, na medida em que o H_3O^+

migra, ele desloca o equilíbrio ácido-base da amostra de tal forma que todos os hidrogênios ácidos migrem em direção ao cátodo, ao mesmo tempo em que o ânion migra em sentido oposto. Dessa forma, a técnica se assemelha a uma titulação, na qual se determina a quantidade de hidrogênios tituláveis da amostra.

No entanto, para que essa análise seja possível, o eletrólito de corrida não pode conter uma base em quantidade suficiente para promover a neutralização do H_3O^+ injetado. Assim como foi mostrado nos resultados das simulações computacionais, eletrólitos aquosos com $\text{pH} > 7$ provocam o consumo dos íons hidrônio injetados.

Com a finalidade de se estudar esse fenômeno, foram feitos experimentos com diversos ácidos com pK_a s diferentes e foi avaliada a quantidade de íons hidrônio capaz de ser determinada sob certas condições. Cada curva analítica foi efetuada com 4 pontos em duplicatas (entre 0 e 3 mmol L^{-1}). As corridas eletroforéticas foram feitas com capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ d.i. x $67,4 \text{ cm}$ de comprimento total (12 cm até o detector). O eletrólito de corrida utilizado foi o cloreto de lítio 10 mmol L^{-1} ($\text{pH} 5,5$). O potencial de corrida foi de 10 kV e a injeção da amostra foi feita hidrodinamicamente por 20 s e $10 \text{ cmH}_2\text{O}$. $\text{KCl } 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi utilizado como padrão interno. Todas as soluções estoque das amostras ácidas foram padronizadas através de titulação potenciométrica utilizando hidróxido de sódio como padrão secundário e hidrogenoftalato de potássio como padrão primário. Todos os experimentos foram realizados seqüencialmente em um mesmo dia para evitar problemas de variação da sensibilidade do sinal analítico.

A tabela 2 mostra os resultados obtidos para o número de hidrogênios tituláveis encontrado para cada ácido estudado. Esse valor foi calculado através da inclinação da curva analítica obtida para cada amostra, tomando como referência a

inclinação para a curva do HCl. Para os ácidos polipróticos, sua concentração analítica foi normalizada pelo número de hidrogênios ácidos da amostra. Os resultados dessa tabela mostram que é possível estimar o número de hidrogênios tituláveis da amostra injetada através da inclinação da curva analítica. Além disso, os resultados mostram também que somente é possível titular ácidos com pK_a igual ou menor que o pH do eletrólito de corrida. Assim, não foi possível observar nenhum sinal referente ao íon H_3O^+ de fenol ($pK_a = 9,98$) ou cloreto de amônio ($pK_a = 9,24$).

Tabela 2. Parâmetros da regressão linear da curva de quantificação e número de hidrogênios tituláveis dos ácidos estudados.

Ácido	A	B	R	H ₃ O ⁺ titulável	pK _a [67][68]
Clorídrico (HCl)	-0,11 (0,18)	8,21 (0,18)	0,99952	1	-7,0 (1)
Acético (HAc)	-0,2 (0,2)	8,3 (0,2)	0,9994	1,01 ± 0,07	4,75 (1)
Sulfúrico (H ₂ SO ₄)	-0,11 (0,09)	16,54 (0,08)	0,99998	2,01 ± 0,03	-2,0 (1) 1,92 (2)
Glutâmico (HGlu)	0,14 (0,10)	6,81 (0,09)	0,99982	0,83 ± 0,03	2,23 (α-CO ₂ H) 4,42 (γ-CO ₂ H) 9,95 (NH ₃)
Fosfórico (H ₃ PO ₄)	-0,02 (0,03)	8,57 (0,03)	0,99999	1,04 ± 0,01	2,15 (1) 7,20 (2) 12,15 (3)
Cloridrato de histidina	0,09 (0,12)	3,8 (0,3)	0,99762	0,46 ± 0,09	1,7 (α-CO ₂ H) 6,02 (NH) 9,08 (NH ₃)
Cítrico (HCit)	-0,04 (0,07)	15,15 (0,06)	0,99998	1,84 ± 0,02	3,12 (1) 4,76 (2) 6,39 (3)
HCl + HAc (1:5 v/v)	0,08 (0,19)	7,03 (0,06)	0,99991	1,71 ± 0,05	
HCl + HAc (5:1 v/v)	-0,1 (0,3)	7,8 (0,2)	0,99959	1,90 ± 0,16	
H ₂ SO ₄ + HCl (1:1 v/v)	-0,1 (0,5)	12,6 (0,2)	0,9997	3,08 ± 0,16	
H ₃ PO ₄ + HAc (1:1 v/v)	0,16 (0,11)	8,49 (0,05)	0,99997	2,07 ± 0,03	
H ₃ PO ₄ + HCl + HAc + HGlu (1:1:1:1 v/v)	-0,1 (0,4)	7,8 (0,2)	0,99929	3,8 ± 0,3	

A e B são os coeficientes (com seus respectivos erros entre parênteses) da equação $Y = A + Bc$, onde Y e c referem-se aos valores do fator de resposta do H₃O⁺ em relação ao padrão interno e concentração analítica da amostra, respectivamente. R - coeficiente de correlação linear. Foi considerado um intervalo de confiança de 95% para o número de H₃O⁺ titulável. Os números 1, 2 e 3 entre parênteses na coluna de pK_a correspondem ao pK₁, pK₂ e pK₃, respectivamente.

3.3.8. Estimativa da mobilidade do íon hidrônio

Nesta parte do trabalho, utilizou-se um capilar de sílica fundida de 75 μm d.i. x 69,5 cm de comprimento total (57,6 cm até o detector). O eletrólito de corrida empregado foi solução de KCl 10 mmol L^{-1} , preparado com água desionizada aquecida até ebulição, na tentativa de eliminação de CO_2 (o pH final da solução foi 6,0). O equipamento foi condicionado a uma temperatura de 29 $^{\circ}\text{C}$. A amostra injetada foi uma solução de ácido clorídrico 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A mobilidade eletroforética aparente do H_3O^+ (μ_{ap}) foi estimada a partir de parâmetros da análise e pelo tempo de migração da espécie registrado no eletroferograma (Eq. 5),

$$\mu_{ap} = \frac{lL}{tV} \quad \text{Eq. 5}$$

onde l e L são, respectivamente, os comprimentos efetivo e total do capilar, t é o tempo de migração do H_3O^+ e V é o potencial de corrida.

Para se estimar sua mobilidade efetiva (μ_{ef}) foi necessário subtrair a contribuição do fluxo eletroosmótico (Eq. 6),

$$\mu_{ef} = \mu_{ap} - \mu_{EOF} \quad \text{Eq. 6}$$

onde μ_{EOF} é a mobilidade do fluxo-eletroosmótico.

A estimativa da mobilidade do EOF foi feita utilizando-se marcas térmicas

[69]. O princípio das marcas térmicas consiste em causar perturbações na concentração do eletrólito de corrida, geradas por um aquecimento pontual do capilar durante a separação, por um curto período de tempo. Após o restabelecimento da temperatura, são criadas marcas permanentes no eletrólito, que migram com o EOF.

O marcador térmico utilizado foi um resistor SMD de 15 Ω , cujo aquecimento foi realizado através da aplicação de 5 V, com largura de pulso de 800 ms.

A figura 19 apresenta um eletroferograma de ácido clorídrico contendo duas marcações térmicas, ambas geradas simultaneamente e com marcadores posicionados a 5,0 cm de distância entre si. O cálculo da mobilidade da marca térmica foi feito utilizando-se a equação 5. Considerou-se a mobilidade da marca térmica como sendo igual à do EOF.

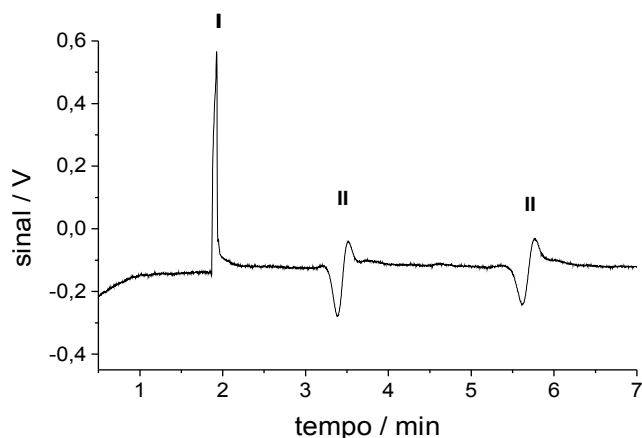


Figura 18. Eletroferograma de solução de ácido clorídrico 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, realizando dupla marcação térmica após 60 s do início da corrida. Eletrólito de corrida: solução de KCl 10 mmol L^{-1} . Potencial de corrida: 9 kV. Capilar: 75 μm d.i. x 70,0 cm de comprimento total (11,7 cm até o detector). Injeção: hidrodinâmica (20 s, 10 cmH_2O). Picos: (I) H_3O^+ e (II) marcas térmicas.

Segundo Haddad e colaboradores [70], a mobilidade eletroforética varia linearmente com a potência dissipada por unidade de comprimento (P/L). No entanto, P/L pode ser expresso por:

$$\frac{P}{L} = \frac{\kappa cr^2 V^2}{L^2} \quad \text{Eq. 7}$$

onde κ e c são a condutância molar e a concentração da solução, respectivamente, r é o raio do capilar, V é o potencial de corrida aplicado e L corresponde ao comprimento do capilar.

Assim, como nas condições do experimento k , c , r e L são constantes, então a mobilidade do H_3O^+ livre do efeito Joule foi obtida a partir da extrapolação do gráfico de mobilidade do H_3O^+ obtido em diferentes potenciais de corrida versus V^2 quando $V^2=0$ (Figura 19).

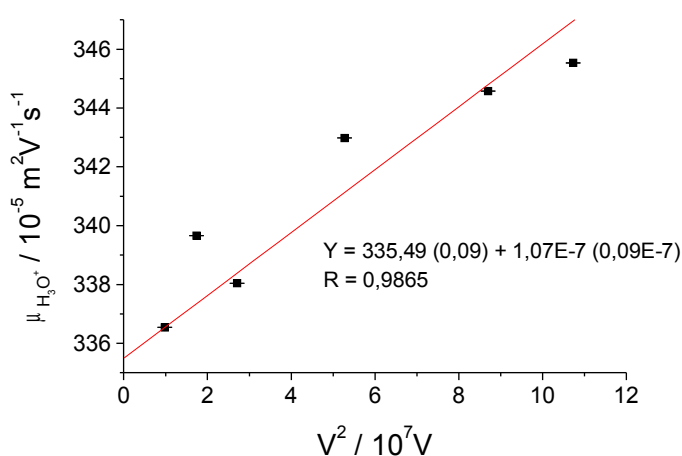


Figura 19. Mobilidades calculadas experimentalmente do íon hidrônio em solução de KCl 10 mmol L⁻¹ a 29 °C em função do potencial aplicado.

O valor esperado para a mobilidade do H_3O^+ considerando a temperatura e a força iônica do meio em que foi realizado o experimento foi obtido a partir da condutância iônica molar da espécie nessas condições (Eq. 8). Para eletrólitos fortes 1:1, ou seja, composto por um cátion e um ânion monovalentes, a equação de Onsager (Eq. 9) permite calcular a condutância iônica molar de um espécie a partir de dados tabelados [71] de condutância iônica molar à diluição infinita. Nessa equação, os parâmetros A e B são constantes que dependem somente da natureza do solvente, em determinada temperatura, e seus valores podem ser encontrados na literatura [72].

$$\mu_v = \frac{\Lambda_v}{F} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\Lambda_v = \Lambda_\infty - (A + B\Lambda_\infty)\sqrt{c} \quad \text{Eq. 9}$$

onde Λ_v é a condutividade iônica molar da espécie v , Λ_∞ é a condutância iônica molar à diluição infinita, c é a concentração do eletrólito de corrida, μ é a mobilidade iônica da espécie v e F é a constante de Faraday.

Dessa forma, para uma solução 10 mmol L^{-1} de KCl a 29°C , os valores de A e B são, respectivamente, 65,692 e 0,22946 [72]. A condutância iônica molar à diluição infinita para o H_3O^+ nessa temperatura, cujo valor obtido foi de 368,4 S, foi estimada a partir da interpolação dos dados presentes na referência [71].

Os valores de mobilidade do H_3O^+ obtidos experimentalmente, com intervalo de confiança de 95%, e o esperado encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Mobilidade calculada experimentalmente e esperada, obtida através de outras técnicas, para o íon hidrônio em solução de KCl 10 mmol L⁻¹ a 29°C.

	$\mu_{\text{H}_3\text{O}^+} / 10^{-5} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
Experimental	335,5 ± 0,2
Esperado	366,2

A mobilidade calculada experimentalmente resultou em um valor 8% menor que o esperado. As possíveis causas para essa variação podem ser atribuídas a:

i. influência do íon HCO_3^- proveniente da absorção de CO_2 atmosférico pelo eletrólito de corrida. A interação ácido-base do H_3O^+ com uma base retardaria a migração dessa espécie.

ii. interação do H_3O^+ com os grupos silanóis da coluna capilar. Nesse caso, o capilar agiria como uma espécie de coluna cromatográfica, causando retenção do íon hidrônio.

3.4. Conclusões parciais

Os estudos envolvendo simulações computacionais na previsão das distribuições de concentrações do íon hidrônio ao longo da coluna mostraram que, para eletrólitos ácidos, o aumento do pH favorece a dissociação dos ácidos fracos, aumentando a concentração de íons hidrônio que migram no sentido do cátodo, principalmente dos ácidos com pK_a s mais elevados. Assim, utilizando eletrólitos de corridas com pH próximo de 7, foi possível observar a migração do íon H_3O^+ até mesmo de ácidos muito fracos, sendo que a sua análise com eletrólitos de pHs maiores que 7 não se mostrou favorável.

Na prática, no entanto, deve-se considerar a interação desse íon com os grupos silanóis que compõem o capilar de sílica. Assim, quanto mais alto o pH do eletrólito de corrida e menor o diâmetro do capilar, maior o efeito de interação do íon hidrônio com a coluna, causando deformações no formato do pico, redução da migração dessa espécie e redução da sensibilidade do sinal analítico.

Estratégias de modificação do capilar através de recobrimento dos grupos aceptores de H_3O^+ não geraram resultados positivos, pois, no caso da silanização, acarretaram grande instabilidade da linha base com a redução do EOF. Em relação ao recobrimento com PEI, a presença de grupos aceptores de prótons no pH de trabalho também resultou em grande interação com o analito. A utilização de um eletrólito não-aquoso diminuiu a interação do H_3O^+ com o capilar. A substituição da água pelo DMSO como solvente do eletrólito de corrida também implicou em aumento significativo do tempo de migração e diminuição da intensidade do sinal do íon hidrônio.

Embora o emprego de eletrólitos de corrida bastante ácidos minimizem a interação do H_3O^+ com a parede interna do capilar, seu valor mínimo é limitado pela presença de picos de sistema com mobilidade próxima à do analito, que começam a surgir em soluções com pHs iguais ou menores que 4,5, aproximadamente.

Em relação à determinação da concentração de hidrogênios ácidos totais, os resultados mostraram somente ser possível quantificar ácidos que tenham pK_a menor ou igual ao pH do eletrólito de corrida. Como consequência, a quantificação de ácidos com pK_a maiores que 7, em meio aquoso, não se mostrou possível, pois em meio básico, os íons hidrônio são neutralizados pelas hidroxilas em excesso do eletrólito.

A mobilidade do íon hidrônio em meio de $\text{KCl } 10 \text{ mmol L}^{-1}$ medida usando EC

foi 8% abaixo do valor esperado, obtido através de outras técnicas. Algumas hipóteses para as causas dessa diferença foram: interação do H_3O^+ com a coluna capilar e interferência do CO_2 atmosférico.

CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DE ÍONS HIDROXILA

4.1. Introdução

Os íons hidroxila (OH^-) partilham de muitas semelhanças com os íons hidrônio, como, por exemplo, mobilidade anormalmente alta quando comparada aos demais ânions. O fator mais significativo da inter-relação dessas duas espécies é a dependência de suas concentrações em meio aquoso, expressa pela constante de dissociação da água. Assim sendo, muitos dos fenômenos observados na análise do íon hidrônio em EC também estão presentes na determinação do íon hidroxila. Logo, os estudos deste íon complementam as informações já obtidas para o primeiro.

Os estudos apresentados neste capítulo englobam: (i) avaliação das condições experimentais para a análise do íon hidroxila em eletroforese capilar em zona, incluindo composição e pH do eletrólito de corrida, influência da absorção do CO_2 atmosférico no eletrólito e interação do analito com a coluna capilar; (ii) avaliação da possibilidade de quantificação da concentração total de íons OH^- tituláveis em amostra de base forte.

4.2. Experimental

Ácido trifluoracético, ácido perclórico e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de potássio, cloreto de lítio, hidróxido de sódio e hidrogenoftalato de potássio tiveram procedência Merck (Darmstadt, Germany).

A solução estoque 10 mmol L^{-1} de NaOH foi padronizada através de titulação

potenciométrica com hidrogenoftalato de potássio previamente seco em estufa a 120 °C, conforme descrito na seção 3.2.1.

O equipamento de EC utilizado e o procedimento de condicionamento do capilar foram os mesmos descrito nas seções 3.2.2 e 3.2.3.

4.3. Resultados e Discussões

4.3.1. Condições para a análise do íon hidroxila

De forma análoga ao que ocorre com o íon hidrônio dentre os cátions, a hidroxila figura como o ânion de maior mobilidade iônica em meio aquoso. Essa característica permite que o íon OH^- seja analisado, além do modo usual para ânions, com o EOF invertido, também com o EOF no sentido normal, com a hidroxila migrando no contra-fluxo.

Nas análises de ânions, em geral, são adicionados, ao eletrólito de corrida, inversores de fluxo, usualmente compostos tensoativos, que invertem a polaridade da superfície interna do capilar, fazendo com que o EOF migre no mesmo sentido que os analitos [47]. Uma segunda estratégia consiste na determinação dessas espécies no contra-fluxo. Neste caso, nenhum inversor de fluxo é adicionado ao eletrólito de corrida. A injeção é realizada na extremidade do capilar referente ao pólo positivo (ânodo) do sistema eletroforético e ânions de baixa mobilidade, migrando no sentido do cátodo para o ânodo, são arrastados pelo EOF no sentido normal (do ânodo para o cátodo). Assim, pode ser observado um sinal referente a essa espécie somente após saída do pico do EOF. No caso de espécies com mobilidade maior que o EOF, uma terceira estratégia consiste na análise

realizada também no contra-fluxo, sem adição de inversores de fluxo ao eletrólito. Porém, neste caso, a amostra é injetada no lado do cátodo e o ânions de alta mobilidade, migrando no sentido oposto, conseguem vencer o EOF. No caso da análise da hidroxila, é possível utilizar a primeira e a terceira estratégias.

Para a determinação das melhores condições experimentais para análise dos íons hidroxila, foram testados diferentes eletrólitos e condições de corrida, sendo alguns ilustrados na figura 20. Eletroferogramas 20A, 20B e 20C foram realizados com o EOF no sentido normal, sendo o OH^- determinado no contra-fluxo. Para a figura 20D, a corrida foi feita com o EOF invertido, utilizando-se CTAB como inversor de fluxo.

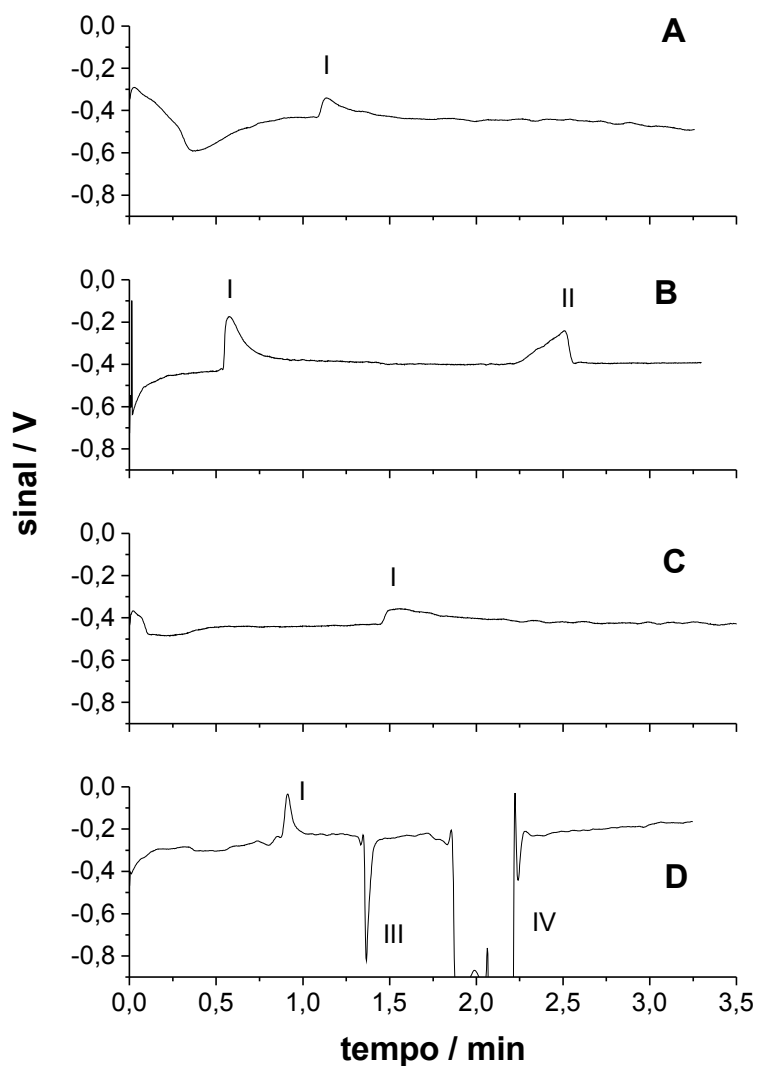


Figura 20. Eletroferogramas da injeção de NaOH nas seguintes condições: capilar de sílica fundida de 75 μm d.i.; (A) eletrólito: LiCl 10 mmol L^{-1} (pH 7,93); 16 kV; amostra 1 mmol L^{-1} ; injeção hidrodinâmica (30 s, 10 cmH_2O); capilar: 60,0 cm de comprimento total (12,0 cm até o detector); (B) eletrólito: trifluoracetato de lítio 10 mmol L^{-1} (pH 9,0); 26 kV; amostra: NaOH 1 mmol L^{-1} e KCl 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; injeção hidrodinâmica (30 s, 10 cmH_2O); capilar: 56,0 cm de comprimento total (45,0 cm até o detector); (C) Eletrólito: LiClO_4 10 mmol L^{-1} (pH 8,9); 10 kV; amostra 0,5 mmol L^{-1} ; injeção hidrodinâmica (20 s, 10 cmH_2O); capilar: 68,0 cm de comprimento total (12,0 cm até o detector); (D) eletrólito: NaCl 10 mmol L^{-1} com CTAB 0,2 mmol L^{-1} (pH 8,0); 8 kV; amostra 1 mmol L^{-1} ; injeção hidrodinâmica (10 s, 10 cmH_2O); capilar: 48,8 cm de comprimento total (36,6 cm até o detector). Picos: (I) OH^- , (II) Cl^- , (III) pico de sistema e (IV) EOF.

As soluções de perclorato de lítio e de trifluoracetato de lítio foram preparadas a partir de uma solução de hidróxido de lítio posteriormente neutralizada com o ácido (ácidos perclórico ou trifluoracético, respectivamente), até atingir o pH desejado. As concentrações referem-se ao íon Li^+ . Optou-se pelo lítio por ser o metal alcalino de mais baixa mobilidade.

Dentre os eletrólitos de corrida estudados, o trifluoracetato de lítio foi o que apresentou melhor relação sinal/ruído. Sendo o eletrólito de menor condutividade, possibilitou a aplicação de potenciais mais elevados sem que fossem gerados grandes problemas na linha base devido ao efeito Joule, diminuindo o tempo de análise.

Optou-se pelo uso do íon Cl^- como padrão interno, pois necessitava-se de uma espécie com mobilidade que superasse a do EOF.

A utilização do CTAB como inversor de EOF oferece a vantagem da diminuição do tempo de análise, devido ao aumento da mobilidade aparente pela soma da mobilidade do EOF à mobilidade efetiva dos analitos, além de possibilitar a determinação de um número maior de espécies aniônicas, inclusive as de baixa mobilidade iônica.

4.3.2. Repetibilidade

Analisando o formato do sinal referente ao OH^- nos eletroferogramas da figura 20, observa-se um sinal assimétrico com cauda, sugerindo uma interação do analito com a sílica do capilar. Além do formato do pico, outro indício dessa interação é o aumento do tempo de migração das espécies em corridas sucessivas da mesma amostra (Figura 21). Os vários tipos de grupos silanóis superficiais presentes na

sílica sofrem reações ácido-base com as amostras básicas injetadas. O aumento na concentração de grupos silanoatos (Si-O^-) desprotonados causa intensificação na mobilidade do EOF e, como os íons OH^- e Cl^- da amostra migram contra-EOF, seus tempos de migração também aumentam com o aumento da mobilidade do EOF. Nos eletroferogramas de 5 corridas sucessivas da figura 21, os aumentos nos tempos de migração do OH^- e do Cl^- foram de 6% e 40%, respectivamente, entre a 1ª e a última corrida. Destaca-se que a variação relativa do tempo de migração de espécies de menor mobilidade, em função de mudanças no EOF, é maior comparativamente às espécies mais rápidas.

Pode-se observar ainda, na mesma figura, que existe um deslocamento da linha base nas regiões anterior e posterior ao pico do OH^- , mais facilmente observável nas primeiras corridas. Essa característica, aliada ao aumento do tempo de migração do Cl^- e à mudança no formato do pico do OH^- com o decorrer de corridas sucessivas sugerem uma mudança no condicionamento do capilar causada pela própria amostra. Devido a isso, nos estudos envolvendo a quantificação do íon hidroxila, foi feita uma renovação do eletrólito que preenche o capilar após cada corrida.

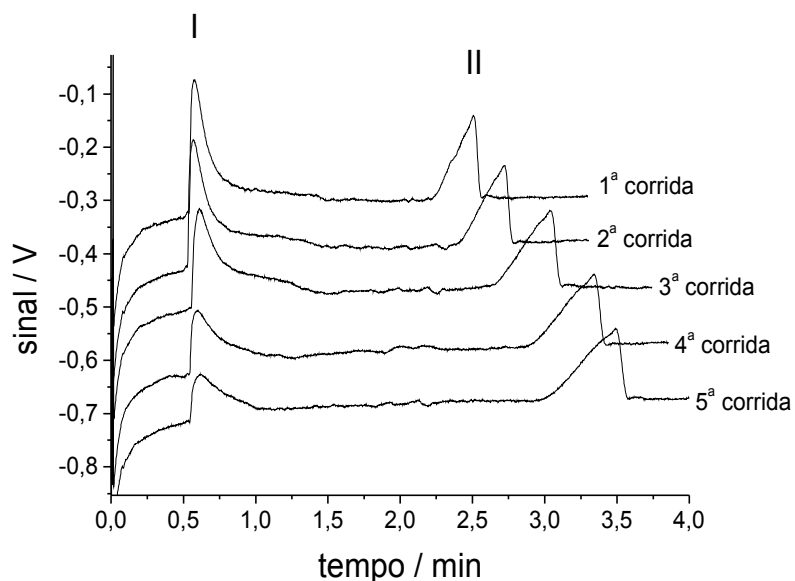


Figura 21. Eletroferogramas de injeções sucessivas de NaOH 1 mmol L⁻¹ utilizando KCl 100 μmol L⁻¹ como padrão interno. Eletrólito de corrida: solução de trifluoracetato de lítio 10 mmol L⁻¹ (pH 8,9). Potencial de corrida: 26 kV. Capilar: sílica fundida, 75 μm d.i. x 56 cm de comprimento total (45 cm até o detector). Injeção: hidrodinâmica (30 s, 10 cmH₂O). Picos: (I) OH⁻ e (II) Cl⁻.

Para a análise dos íons OH⁻, a presença de qualquer ácido no eletrólito de corrida é indesejada, pois causa a neutralização parcial do analito. Dessa forma, é importante que o pH da solução seja maior ou igual a 7. No entanto, soluções não-tamponadas são muito suscetíveis a mudanças de pH. A absorção de CO₂ atmosférico pode promover esse tipo de alteração, levando o pH para regiões de neutralidade, em meio básico. Alterações na concentração hidrogeniônica do eletrólito de corrida são indesejáveis nas análises por EC, pois podem implicar em perda de resolução, eficiência e alterações no EOF [58].

Além disso, um outro fator que pode contribuir para a mudança de pH do

eletrólito de corrida é a reação de soluções básicas com a sílica do capilar, que renova a camada superficial da coluna em contato com a solução que o preenche e reduz o pH do eletrólito.

4.3.3. Picos de sistema

Gas e Kenndler [42] demonstraram que picos de sistema com mobilidades próximas à da hidroxila podem surgir em eletrólitos de corrida básicos. Conforme mostrado no eletroferograma da figura 22, a injeção de um *plug* d'água em um eletrólito de corrida com pH 8,9 fornece um sinal com mobilidade semelhante à do OH^- , inviabilizando sua análise em soluções com pH iguais ou superiores a esse valor.

As discussões acerca da origem desses picos de sistema encontram-se na seção 3.3.5 do capítulo referente à análise do íon hidrônio.

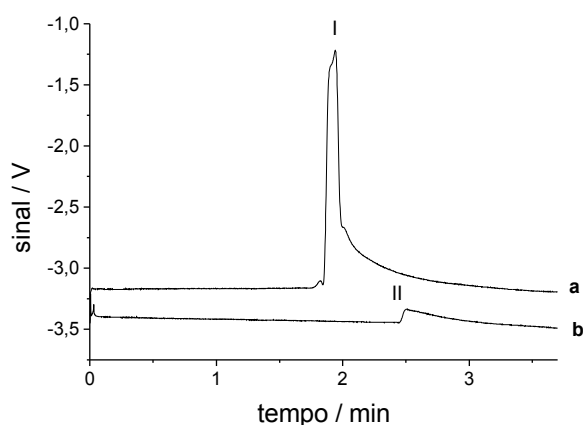


Figura 22. Eletroferograma de (a) solução de NaOH $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) água. Eletrólito de corrida: solução de trifluoracetato de lítio 10 mmol L^{-1} (pH 8,9). Potencial de corrida: 10 kV. Injeção hidrodinâmica (20 s, $10 \text{ cmH}_2\text{O}$). Capilar: sílica fundida, $75 \mu\text{m}$ d.i., 67,2 cm de comprimento total (12,0 cm até o detector). Picos: (I) OH^- e (II) pico de sistema.

4.3.4. Quantificação

Uma vez que os métodos usuais de determinação e quantificação para o íon hidroxila são os mesmos utilizados para o íon hidrônio, ou seja, titulação ácido-base e potenciometria, as vantagens e desvantagens da utilização da EC para a quantificação do OH^- também são os mesmos que constam na seção 3.3.7 do capítulo 3.

A linearidade, limite de detecção e quantificação do método foram avaliados para uma amostra de NaOH. A solução estoque de NaOH foi padronizada por titulação potenciométrica com hidrogenoftalato de potássio previamente seco em estufa a 120 °C. Posteriormente, as soluções padrões foram preparadas diluindo-se o estoque em água desionizada.

As corridas foram realizadas utilizando-se solução de trifluoracetato de lítio 10 mmol L⁻¹ (pH 8,5) como eletrólito de corrida. O potencial de corrida aplicado foi de 10 kV, a injeção foi realizada hidrodinamicamente por 20 s a 10 cmH₂O. O capilar empregado foi o de sílica fundida de 75 µm d.i., 67,2 cm de comprimento total (12 cm até o detector). A integração numérica dos picos registrados nos eletroferogramas foi feita com o programa FityK 0.7.4 [66].

A curva analítica da amostra de NaOH (figura 23) mostrou uma faixa de resposta linear na faixa de 0,5 mmol L⁻¹ a 7 mmol L⁻¹ e coeficiente de correlação maior que 0,998 em escala di-log.

Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 3 µmol L⁻¹ e 10 µmol L⁻¹, respectivamente. Esses valores foram estimados a partir dos parâmetros da curva analítica, utilizando as equações 5 e 6 do capítulo 3.

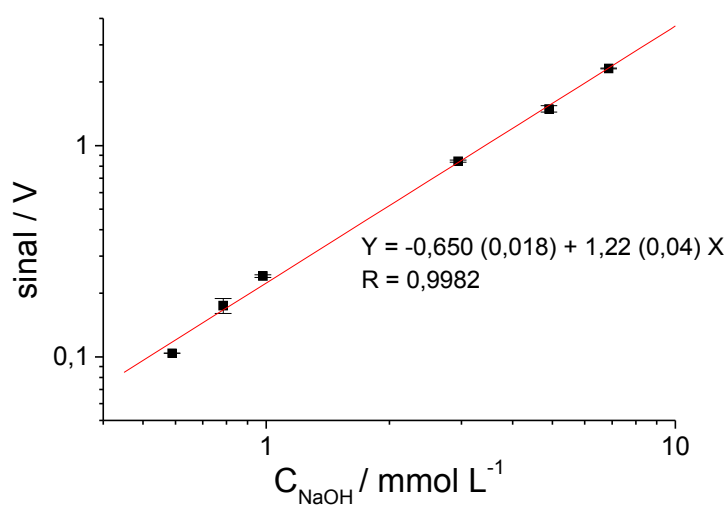


Figura 23. Curva analítica para amostra de hidróxido de sódio. Concentrações de 0,5 mmol L⁻¹ a 7 mmol L⁻¹ do composto. Média e desvio padrão de duplicatas.

4.4. Conclusões parciais

Os resultados mostraram a possibilidade da análise dos íons hidroxila com a determinação do analito contra-EOF ou utilizando-se um inversor de EOF. O segundo possui as vantagens da determinação simultânea de um número maior de ânions, já que somente espécies de alta mobilidade podem ser analisadas no primeiro modo, e da redução no tempo de migração do OH⁻. No entanto, a análise contra-EOF possibilitou melhores condições para o estudos fundamentais sobre o comportamento eletroforético do íon hidroxila, uma vez que a composição do eletrólito de corrida, neste caso, é menos complexa.

Assim como ocorre com a determinação dos íons hidrônio, o eletrólito de corrida utilizado apresentou uma limitação de região de pH para a análise do íon

hidroxila. Nesse caso, eletrólitos com pH acima de 8,9 apresentaram picos de sistema com mobilidades próximas à do analito, inviabilizando sua utilização.

Alguns problemas encontrados em relação a repetibilidade das análises foram decorrentes de (i) interação do analito com os grupos silanóis do capilar, (ii) reação de soluções básicas com a sílica do capilar, causando consumo do analito e redução do pH do eletrólito de corrida e (iii) alterações na composição do eletrólito de corrida causadas pela absorção de CO₂ atmosférico. Apesar disso, a quantificação do OH⁻ na faixa de 0,5 a 7,0 mmol L⁻¹ em base forte se mostrou possível.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A simulação computacional mostrou que, na ausência de interferência dos grupos silanóis e utilizando-se um sistema de detecção adequado, ácidos com $pK_a \leq 10$ poderiam ser determinados utilizando-se a eletroforese capilar, empregando eletrólitos de corrida neutros.

No entanto, na prática, os íons hidrônio e hidroxila apresentaram interação com os grupos silanóis do capilar de sílica. Assim, observou-se que a análise dos íons H_3O^+ era favorecida em $pH \sim 5,0$, uma vez que nessa região a interação do analito com a superfície do capilar era menor. De forma análoga, a determinação dos íons hidroxila era favorecida em $pH \sim 8,5$. Outro fator que influenciou na escolha desses pHs foi a presença de picos de sistema com mobilidade próxima à dos analitos em $pH < 4,5$ e $pH > 9,0$.

O diâmetro do capilar também mostrou influência direta no grau de interação dos íons hidrônio e hidroxila com a superfície do capilar, sendo que quanto maior o diâmetro do capilar, menor a interação.

Tentativas de minimização dos efeitos da interação do íon H_3O^+ envolveram estratégias de modificação do capilar, como silanização e recobrimento com PEI. No entanto, elas não geraram resultados positivos, pois, no caso da silanização, acarretaram instabilidade da linha base devido a redução do EOF. Em relação ao recobrimento com PEI, a presença de grupos aceptores de prótons no pH de trabalho resultou em consumo do analito.

A utilização de um eletrólito não-aquoso diminuiu a interação do H_3O^+ com o capilar. Como perspectiva, estudos adicionais envolvendo solventes não-aquosos ou

solventes orgânicos como aditivos no eletrólito de corrida poderiam melhorar a performance da análise dos íons hidrônio e hidroxila.

A mobilidade do íon hidrônio em meio de KCl 10 mmol L⁻¹ medida usando EC foi 8% abaixo do valor obtido através de outras técnicas. Algumas hipóteses para as causas dessa diferença foram: interação do H₃O⁺ com a coluna capilar e interferência do CO₂ atmosférico. A comparação com a determinação da mobilidade de outros cátions que não sofram esse tipo de interferência e que apresentem ou não adsorção na superfície interna do capilar poderiam ajudar a entender melhor as causas dessa variação.

Um outro aspecto interessante que mereceria ser avaliado posteriormente consiste no estudo da mobilidade do íon hidrônio em (i) meio deuterado, (ii) eletrólitos em meio aquoso-orgânico ou mesmo (iii) meio não-aquoso. Outro ponto seria a utilização da EC na determinação das constantes de associação do íon H₃O⁺ com alguns compostos, como, por exemplo, metanol ou outros solventes orgânicos.

Em relação à determinação da concentração de H₃O⁺ tituláveis totais, foi possível quantificar ácidos com pK_a menor ou igual ao pH do eletrólito de corrida, numa faixa de 0,5 mmol L⁻¹ a 10 mmol L⁻¹. Como consequência, a quantificação de ácidos com pK_a > 7, em meio aquoso, não foi possível.

Foi mostrada também a possibilidade de determinação do íon hidroxila contra-EOF ou utilizando-se um inversor de EOF. O segundo possui as vantagens da determinação simultânea de um número maior de ânions, já que somente espécies de alta mobilidade podem ser analisadas no primeiro modo, e também pela redução do tempo de migração de espécies aniônicas. No entanto, a análise contra-EOF possibilitou melhores condições para estudos fundamentais sobre o comportamento eletroforético do íon hidroxila, uma vez que a composição do

eletrólito de corrida, neste caso, é menos complexa. A quantificação da concentração total de íons hidroxila tituláveis em amostra de base forte se mostrou possível na faixa de 0,5 a 7,0 mmol L⁻¹.

As principais dificuldades encontradas na análise dos íons hidroxila por EC consistiram na falta de repetibilidade da intensidade e perfil do sinal analítico e dos tempos de migração decorrentes de: (i) interação do analito com os grupos silanóis do capilar, (ii) reação de soluções básicas com a sílica do capilar, com consumo do analito e redução do pH do eletrólito de corrida e (iii) absorção de CO₂ atmosférico pelo eletrólito de corrida. Dessa forma, para a quantificação do OH⁻, seria vantajoso acrescentar uma quantidade conhecida de uma solução padrão ácida e determinar o H₃O⁺ em excesso, num processo semelhante a uma titulação de retorno.

O emprego da EC como alternativa à titulação potenciométrica apresenta vantagens intrínsecas à própria técnica, como reduzido volume de amostra e reagentes consumidos. Dessa forma, sua aplicação seria justificada na determinação da concentração de íons hidrônio e hidroxila tituláveis totais de amostras que não se dispõe de grande quantidade, como, por exemplo, amostras biológicas.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chagas, A.P. *Química Nova* **2000**, 23, 126-133.
2. Leicester, H.M. *The historical background of chemistry* New York: Dover, 1971, 199-212.
3. Salzberg, H.W. *From caveman to chemist* Washington DC: American Chemical Society, 1995, 255-257.
4. Hudson, J. *The history of chemistry* Hong Kong: MacMillan, 1994, 217-221.
5. Jensen, W.B. *The Lewis acid-base concepts* New York: Wiley, 1980.
6. Kornyshev, A.A.; Kuznetsov, A.M.; Spohr, E.; Ulstrup, J. *The Journal of Physical Chemistry* **2003**, 107, 3351-3366.
7. Pang, X- F.; Feng Y-P. *Chemical Physics Letters* **2003**, 373, 392-401.
8. Agmon, N. *Chemical Physics Letters* **1995**, 244, 456-462.
9. Day, T. J. F.; Schmitt, U. W.; Voth, G.A. *Journal of American Society* **2000**, 122, 12027-12028.
10. Drukker, K.; Leeuw, S. W.; Hammes-Schiffer, S. *Journal of Chemical Physics* **1998**, 108, 6799-6808.
11. Marx, D.; Tuckerman, M. E.; Hutter, J.; Parrinello, M. *Nature* **1999**, 397, 601-604.
12. von Grothuss, C.J.T. *Annales de Chimie* **1806**, LVIII, 54-74.
13. Glasstone, S., Laidler, K.J., Eyring H. *The Theory of Rate Processes: The Kinetics of Chemical Reactions, Viscosity, Diffusion and Electrochemical Phenomena* New York: McGraw Hill, 1941.
14. Conway, B.E., Bockris, J.O.M., Linton H. *Journal of Chemical Physics* **1956**, 24, 834-850.

15. Huggins, M.L. *The Journal of Physical Chemistry* **1936**, 40, 723-731.
16. Bell, R.P. *The proton in chemistry* Ithaca, NY: Cornell University Press, 1973.
17. Agmon, N. *Chemical Physics Letters* **1995**, 244, 456-462.
18. Agmon, N. *Chemical Physics Letters* **2000**, 319, 247-252.
19. Bernal, J.D., Fowler, R.H. *The Journal of Chemical Physics* **1933**, 1, 515-548.
20. Decoursey, T.E. *Physiological Reviews* **2003**, 93, 475-579.
21. Atkins, P.W. *Physical Chemistry* Great Britain: Richard Clay, 1990, 748-776.
22. Bockris, J.O.M., Reddy, A.K.N. *Modern electrochemistry* New York: Plenum Press, 1998, 476-505.
23. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. *Analytical chemistry: an introduction* EUA: Harcourt College, 2000, 471-507.
24. de Borba, B.M., Kinchin, C.M., Sherman, D., Cook, T.K., Dasgupta, T.K., Srinivasan, K., Pojhl, C.A. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 96-100.
25. Fornaro, A., Gutz, I.G.R. *Atmospheric Environment* **2003**, 37, 117-128.
26. Nagyová, I.; Kaniánsky, D. *Journal of Chromatography A* **2001**, 916, 191-200.
27. Tavares, M.F.M. *Química Nova* **1996**, 19, 173-181.
28. Tiselius, A., *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Uppsaliensis*, Tese de Doutorado, Suécia, 1930.
29. Hjerten, S. *Chromatographic Reviews* **1967**, 9, 122.
30. Virtanen, R. *Acta Polytechnica Scandinavica - Chemical Technology Series* **1974**, 123, 1.
31. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, T.P.E.M. *Journal of Chromatography* **1979**, 169, 11.
32. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. *Analytical Chemistry* **1981**, 53, 1298.
33. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T. *Analytical Chemistry*

- 1984, 56, 111.
34. Cohen, A.S., Karger, B.L. *Journal of Chromatography* **1987**, 397, 409.
35. Cohen A.S., Paulus, A., Karger, B.L., *Chromatographia* **1987**, 24, 15.
36. Harakuwe, A.H., Haddad, P.R. *Journal of Chromatography A* **1999**, 834, 213-233.
37. Tavares, M.F.M. *Química Nova* **1997**, 20, 493-511.
38. Yiu, C.Y. *Electrophoresis* **2001**, 22, 612-628.
39. Horvath, J., Dolnik, V. *Electrophoresis* **2001**, 22, 644-655.
40. Hayes, M.A., Ewing, A.G. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 512-516.
41. Culbertson, C.T., Jorgenson, J. *Journal of Microcolumn Separations* **1999**, 11, 167-174.
42. Gas, B., Kenndler, E. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3901-3912.
43. Gebauer, P., Beckers, J.L., Bocek, P. *Electrophoresis* **2002**, 23, 1779-1785.
44. Stedry, M., Jaros, M., Vcelakova, K., Gas, B. *Electrophoresis* **2003**, 24, 536-547.
45. Stedry, M., Jaros, M., Hruska, V., Gas, B. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3071-3079.
46. Beckers, J.L., Bocek, P. *Electrophoresis* **2002**, 33, 1947-1952.
47. Timerbav, A.R. *Electrophoresis* **2004**, 25, 4008-4031.
48. Jager, A.V., Tavares, M.F.M. *Química Nova* **2001**, 24, 363-373.
49. Huang, Y.F., Huang, C.C., Hu, C.C., Chang, H.T. *Electrophoresis* **2006**, 27, 3503-3522.
50. Zemmann, A.J. *Electrophoresis* **2003**, 24, 2125-2137.
51. Kuban, P., Hauser, P. *Electroanalysis* **2004**, 16, 2009-2021.
52. Fracassi da Silva, J.A., do Lago, C.L. *Electrophoresis* **2000**, 21, 1405-1408.
53. Fracassi da Silva, J.A.; do Lago, C.L. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 4339-4343.
54. Zemmann, J.A., Schnele, E., Volgger, D., Bonn, G.K. *Analytical Chemistry* **1998**,

- 70, 563-567.
55. Fracassi da Silva, J.A., Guzman, N., do Lago, C.L. *Journal of Chromatography A* **2002**, 942, 249-258.
56. Brito-Neto, J.G.A., Fracassi da Silva, J.A., Blanes, L., do Lago, C.L. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1198-1206.
57. Brito-Neto, J.G.A., Fracassi da Silva, J.A.F., Blanes, L., do Lago, C.L. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1207-1214.
58. Kenndler, E., Friedl, W. *Journal of Chromatography* **1992**, 608, 161-170.
59. de Jesus, D.P.; Brito-Neto, J.G.A.; Richter, E.M.; Angnes, L.; Gutz, I.G.R.; do Lago, C.L. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 607-614.
60. Mioshi, R.N.; do Lago, C.L. *Analytica Chimica Acta* **1996**, 334, 271-278.
61. Press, W.H.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T.; Flannery, B.P. *Numerical Recipes in C: the art of scientific computing*, 1996.
62. Towns, J.K., Regnier, F. *Journal of Chromatography* **1990**, 516, 69-78.
63. Erim, F.B.; Cifuentes, A.; Poppe, H.; Kraak, J. C. *Journal of Chromatography A* **1995**, 708, 356-361.
64. Fillet, M., Servais, A.C., Crommen, J. *Electrophoresis* **2003**, 24, 1499-1507.
65. Cottet, H., Struijk, M.P., Van Dongen, J.L.J., Claessens, H.A., Cramers, C.A. *Journal of Chromatography A* **2001**, 915, 241-251.
66. <http://www.unipress.waw.pl/fityk/> , acessado em 09/02/07.
67. Atkins, P.W. *Physical Chemistry* New York: Oxford University, 1995, C18-C19.
68. Harris, D.C. *Análise Química Quantitativa* Rio de Janeiro: LTC, 2001, 782-792.
69. Saito, R.M., Neves, C.A., Lopes, F.S., Blanes, L., Brito-Neto, J.G.A., do Lago, C.L. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 215-223.
70. Evenhuis, C.J., Gujit, R.M., Macka, M., Marriot, P.J., Haddad, P.R. *Analytical*

Chemistry **2006**, 78, 2684-2693.

71. Robinson, R.A., Stokes, R.H. *Electrolyte solutions: the measurement and interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes* London: Butterworths, 1955, 454.
72. Conway, B.E. *Electrochemical data* Netherlands: Elsevier, 1952, 138-180.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)