

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE
CÁTIONS INORGÂNICOS EM
FORMULAÇÕES MINERAIS E FITOQUÍMICAS
POR ELETROFORESE CAPILAR
COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alice Raabe

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO
DE CÁTIONS INORGÂNICOS EM
FORMULAÇÕES MINERAIS E FITOQUÍMICAS
POR ELETROFORESE CAPILAR
COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA**

por

Alice Raabe

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁTIONS
INORGÂNICOS EM FORMULAÇÕES MINERAIS E FITOQUÍMICAS
POR ELETROFORESE CAPILAR
COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA**

elaborada por
Alice Raabe

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Simone Stülp (UNIVATES)

Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa (UFSM)

Santa Maria, 18 de novembro de 2010.

*“Depois de algum tempo você percebe a diferença,
a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma.
E você aprende que amar não significa apoiar-se,
e que companhia nem sempre significa segurança.
E começa a aprender que beijos não são contratos e
presentes não são promessas.
Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante,
com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.
E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é
incerto demais para os planos,
e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.
Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o
que você aprendeu com elas
do que com quantos aniversários você celebrou.
Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.
Então, plante seu jardim e decore sua alma,
ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.
E você aprende que realmente pode suportar...
que realmente é forte, e que pode ir muito mais
longe, depois de pensar que não se pode mais...”*

(William Shakespeare)

Dedico este trabalho aos meus pais
Cleomar Jair Raabe e Lourdes Elidia Henn Raabe
pelos esforços, dedicação, compreensão,
incentivo e amor incondicional sempre demonstrados.

Ao meu namorado **Mairo Loch Biscaglia Ferreira**
pela sua compreensão, ajuda, cumplicidade, apoio e
sua grandiosa paciência e principalmente pelo seu amor.

Sem vocês nada disso teria sido possível
e minha vitória não seria completa.

Obrigada de coração por tudo mesmo!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, orientação, paciência e compreensão, e por todas as contribuições para a minha formação pessoal e profissional, principalmente pelos seus ensinamentos de grande valia.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento e a Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento pela amizade.

A todos os colegas e amigos do LACHEM, pela convivência, pelo carinho, pela ajuda, pelo apoio e os momentos de descontração vividos durante todo esse período.

Gostaria de agradecer em especial a Daiane Dias, Mariele Martini, Tatiana Falcão, Ana Paula Moreira, Carla Sant'Ana, Larissa S. Müller, Luciana A. Gobo e Géssica Silveira pelos conselhos, a ajuda e a amizade, o carinho, e pelas risadas e seus ombros amigos! E principalmente pela sinceridade e cumplicidade.

Aos meus pais Cleomar Jair Raabe e Lourdes Elidia Henn Raabe que sempre me apoiaram e ajudaram, com incentivos, palavras, carinho e compreensão. Pelo apoio financeiro e pessoal, muito obrigada a vocês.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa do mestrado.

“A Deus pela oportunidade de estar aqui e por me mostrar o caminho!”

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁTIONS INORGÂNICOS EM FORMULAÇÕES MINERAIS E FITOQUÍMICAS POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA

AUTORA: ALICE RAABE

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de novembro de 2010.

A determinação seletiva de cátions inorgânicos, como metais alcalinos, alcalinos terrosos, de transição e o íon amônio (NH_4^+) é considerada uma prática difícil, pois geralmente estes íons apresentam mobilidades aparentes muito próximas, pela semelhança de seus tamanhos (raios iônicos hidratados) e mesmas cargas, em alguns casos, podendo inviabilizar a separação.

Este trabalho descreve a determinação simultânea de 14 analitos: amônio (NH_4^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}), tálio (Tl^+), cromo (Cr^{3+}), chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e níquel (Ni^{2+}). O mecanismo de separação utilizado foi a eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*) com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) – CZE- C^4D . As condições experimentais otimizadas para a determinação dos cátions foram: eletrólito de trabalho MES/His 30 mmol L^{-1} , contendo éter 18-coroa-6 1,5 mmol L^{-1} , em pH 6; seguida de uma segunda etapa contendo ácido cítrico 1 mmol L^{-1} na sua composição, para a determinação seletiva dos íons K^+ e Tl^+ . Ainda outros parâmetros operacionais como o potencial de separação de -10 kV, a temperatura de trabalho de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica por gravidade das amostras (20 cm *versus* 60 s), e o detector C^4D operando com frequência de 600 kHz e variando a amplitude em 2 V_{pp} (pico a pico).

A metodologia desenvolvida foi avaliada para os 14 analitos, onde o método mostrou-se adequado para a determinação dos cátions inorgânicos estudados apresentando amplas faixas lineares de trabalho de 5,18 a 2.217,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 19,00 a 1.538,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os íons NH_4^+ e Cr^{3+} , respectivamente; apresentando também limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os analitos. O estudo também envolveu a análise desses metais em amostras reais e de matrizes distintas, como formulações fitoterápicas e formulações de fertilizantes minerais.

Palavras-chaves: cátions inorgânicos, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato, formulações minerais e fitoquímicas.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Program of Pos-Graduation in Chemistry
Federal University of Santa Maria

METHODOLOGY FOR INORGANIC CATIONS DETERMINATION IN MINERAL AND FITOCHEMICAL FORMULATIONS THROUGH CAPILLAR ELECTROPHORESIS WITH CONDUCTIVITY DETECTION

AUTHOR: ALICE RAABE

ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Place and Date of Defense: Santa Maria, November, 18th, 2010.

The selective determination of inorganic cations, like alkaline, earth-alkaline, of transition and the ammonium ion (NH_4^+) is considered as a difficult practice, because generally, these ions show very close apparent mobilities, by the similarities in their sizes (hydrated ionic rays) and same charges, in some cases it may make the separation not viable.

This work describes the simultaneous determination of 14 analytes: ammonium (NH_4^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), sodium (Na^+), magnesium (Mg^{2+}), manganese (Mn^{2+}), thallium (Tl^+), chrome (Cr^{3+}), lead (Pb^{2+}), cadmium (Cd^{2+}), zinc (Zn^{2+}), copper (Cu^{2+}), cobalt (Co^{2+}) and nickel (Ni^{2+}). The mechanism of separation used was the capillary zone electrophoresis (CZE, *capillary zone electrophoresis*) with capacitively coupled contactless conductivity detection (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) – CZE- C^4D . The experimental conditions optimized to the determination of cations were: working electrolyte 30 mmol L^{-1} MES/His, containing 1.5 mmol L^{-1} 18-crown-6 ether, in pH 6; followed by a second stage containing 1 mmol L^{-1} citric acid in its composition to the selective determination of ions K^+ and Tl^+ . Even other operational parameters with the separation potential of -10 kV, the work temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, hydrodynamic injection by the samples gravity (20 cm *versus* 60 s), and the detector C^4D operating with the frequency of 600 kHz and varying the amplitude in 2 V_{pp} (peak to peak).

The developed methodology was evaluated for the 14 analytes, where the method was shown adequate to the determination of inorganic cations studied, showing wide linear work rates of 5.18 to 2,217.06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and of 19.00 to 1,538.46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for ions NH_4^+ and Cr^{3+} , respectively; also showing limits of detection (LD) and of quantification (LQ) in the order of $\mu\text{mol L}^{-1}$ for all analytes. The study also involved the analysis of the alkaloids in real samples and in distinct molds, like phytotherapyc formulations and formulations of mineral fertilizers.

Key-words: inorganic cations, capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, mineral and phytochemical formulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Forças atuantes em um íon e sua esfera iônica durante a migração eletroforética (TAVARES, 1996).23
- Figura 2:** Tubo capilar representado com as camadas que o compõem (DANIELI, 2005).....24
- Figura 3:** Modelo para interface capilar/solução; onde: (A) dupla camada elétrica, (B) representação da eletrosmose, e PC é o plano de cisalhamento (SPENGLER, 2009).....25
- Figura 4:** Representação do perfil radial da eletrosmose e do perfil laminar da HPLC. Adaptado de HARRIS, 2005.26
- Figura 5:** Esquema simplificado da reação de complexação de uma espécie catiônica, com o pólo positivo na extremidade da injeção. Representados o complexante (L), o cátion (M), a direção do fluxo eletrosmótico (EOF) e a direção da mobilidade aparente do complexo (μ_{ap}) em equilíbrio. Adaptado de JAGER & TAVARES, 2001.28
- Figura 6:** Princípio da CZE; onde (A) é o estado inicial e (B) migração diferenciada das zonas distintas dos analitos. Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.32
- Figura 7:** Formação do complexo metal/18-coroa-6 (TAKAYANAGI, 2005).33
- Figura 8:** Instrumentação básica para eletroforese capilar.34
- Figura 9:** Representação da injeção hidrodinâmica por gravidade e injeção eletrocínética.35
- Figura 10:** Esquema de detecção utilizando modo UV-Vis; (d.i.) representa o diâmetro interno do capilar; (j.d.), a janela de detecção; (A) abertura da janela de detecção, correspondente ao d.i. do capilar; (hv), luz emitida pela fonte (200 – 900 nm). Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.37
- Figura 11:** Esquema de detecção utilizando cela condutométrica (CD), onde esta está em contato direto com a solução analisada; (FAT) representa a fonte de alta tensão ligada aos eletrodos de platina. Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.38
- Figura 12:** Esquema representativo da cela C⁴D, composta pelo capilar, gap de detecção, eletrodo de para excitação e eletrodo de registro do sinal resultante. Adaptado de KUBAN & HAUSER, 2008.39
- Figura 13:** Esquema representativo do *stacking* mediado por força iônica; onde *E* representa o campo elétrico; *vep*, a velocidade eletroforética; *veo*, a velocidade eletrosmótica; BGE, o eletrólito de trabalho (MORAES *et al.*, 2009).40
- Figura 14:** Esquema representativo do *stacking* em campo amplificado; onde *E* representa o campo elétrico; *vep*, a velocidade eletroforética; *veo*, a velocidade eletrosmótica; BGE, o eletrólito de trabalho (MORAES *et al.*, 2009).42

| | |
|---|----|
| Figura 15: Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO <i>et al.</i> , 2009). | 48 |
| Figura 16: Foto real e descritiva do equipamento de CE-C ⁴ D construído em laboratório. | 49 |
| Figura 17: Representação esquemática das peças confeccionadas para o CE-C ⁴ D; onde (A) injeção hidrodinâmica, (B) lavagem do capilar (aplicação de vácuo) e aplicação de tensão; (a) carro de impressora com motor de passos, (b) guias de silicone para o capilar, (c) garra manipuladora, (d) reservatório da solução, (e) braço eletromecânico, (f) bloco de acrílico para a aplicação de vácuo, (g) borracha sintética para vedação. As setas bilaterais representam os movimentos realizados por cada componente das peças projetadas (CARVALHO <i>et al.</i> , 2009). | 50 |
| Figura 18: Amostradores automáticos construídos para o sistema CE-C ⁴ D. | 51 |
| Figura 19: Fonte de alta tensão empregada no sistema CE-C ⁴ D desenvolvido. | 52 |
| Figura 20: Sistema de lavagem do capilar por aplicação de vácuo. | 52 |
| Figura 21: Sistema de controle de temperatura do sistema CE-C ⁴ D, com <i>display</i> digital (A) e sensor de temperatura (B). | 53 |
| Figura 22: Gerador de funções (onda senoidal) do sistema CE-C ⁴ D. | 54 |
| Figura 23: Detector de condutividade sem contato (C ⁴ D). | 54 |
| Figura 24: Representação esquemática do detector condutométrico construído para o equipamento de eletroforese capilar contendo capilar de sílica fundida, eletrodos e amplificadores operacionais (CARVALHO <i>et al.</i> , 2009). | 55 |
| Figura 25: Variação da concentração do eletrólito MES/His (n = 3); NH ₄ , K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L ⁻¹ e TI, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L ⁻¹ ; Eletrólito de trabalho: MES/His contendo éter 18-coroa-6 2 mmol L ⁻¹ , pH 6. Potencial de separação: -10kV. Capilar: sílica fundida 75 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detector C ⁴ D operando com 600 kHz e 2 V _{pp} ; temperatura: 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s. | 62 |
| Figura 26: NH ₄ , K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L ⁻¹ e TI, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co, Ni em 4 mg L ⁻¹ ; Eletrólito de trabalho: MES/His 30 mmol L ⁻¹ sem éter 18-coroa-6, pH 6. Condições experimentais iguais a Figura 25. | 63 |
| Figura 27: Variação da concentração do éter 18-coroa-6 (n = 3) no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L ⁻¹ , pH 6). | 65 |
| Figura 28: Eletroferograma representativo da separação dos analitos: NH ₄ , K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L ⁻¹ e TI, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L ⁻¹ ; Eletrólito de trabalho: MES/His 30 mmol L ⁻¹ contendo éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ , pH 6. | 66 |
| Figura 29: Aumento do tempo de migração dos analitos na presença dos solventes ACN, EtOH e MeOH 5% (v/v) na composição do eletrólito de trabalho (n = 3). | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 30: Diminuição dos sinais dos analitos na presença dos solventes ACN, EtOH e MeOH na composição do eletrólito de trabalho (n = 3). | 68 |
| Figura 31: Adição de (A) HIBA 5 mmol L ⁻¹ e de (B) HLac 10 mmol L ⁻¹ na composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ , pH 6). | 69 |
| Figura 32: Diminuição dos sinais dos analitos na presença de HIBA 5 mmol L ⁻¹ e de HLac 10 mmol L ⁻¹ (n = 3) na composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ , pH 6). | 70 |
| Figura 33: Eletroferograma representativo da separação dos analitos: NH ₄ , K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L ⁻¹ e Tl, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L ⁻¹ ; Eletrólito de trabalho: MES/His 30 mmol L ⁻¹ contendo éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ e ácido cítrico 1mmol L ⁻¹ , pH 6. | 71 |
| Figura 34: Variação dos tempos de migração dos íons Tl ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ e Na ⁺ em função da concentração do ácido cítrico (n = 3) no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ , pH 6). | 73 |
| Figura 35: Variação das áreas dos íons Tl ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ e Na ⁺ em função da concentração de ácido cítrico (n = 3) no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ , pH 6). | 74 |
| Figura 36: Variação dos T _m dos analitos em função do pH (n = 3) do eletrólito de trabalho, a 25°C (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹). | 76 |
| Figura 37: Variação da intensidade dos sinais dos analitos em função do pH (n = 3) do eletrólito de trabalho, a 25°C (MES/His 30 mmol L ⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹). | 77 |
| Figura 38: Variação dos T _m dos analitos em função da variação do potencial de separação aplicado (n = 3). | 78 |
| Figura 39: Variação da intensidade dos sinais dos analitos em função da variação do capilar (n = 3). | 79 |
| Figura 40: Eletroferograma dos nutrientes presentes nas amostras de <i>Persea americana</i> (A) e <i>Cyperus rotundus</i> (B), após digestão ácida. | 91 |
| Figura 41: Amostra de <i>Persea americana</i> contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L ⁻¹ , NH ₄ , K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L ⁻¹ (A), e com Tl em 6 mg L ⁻¹ (B). | 92 |
| Figura 42: Eletroferograma dos nutrientes presentes na amostra do fitoterápico Pholia magra, após digestão ácida. | 93 |
| Figura 43: Amostra de Pholia magra contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L ⁻¹ , NH ₄ , K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L ⁻¹ (A), e com Tl em 6 mg L ⁻¹ (B). . | 94 |

Figura 44: Eletroferograma dos nutrientes presentes na amostra do fertilizante sólido (A) e do fertilizante líquido (B), após digestão ácida.96

Figura 45: Amostra de fertilizante líquido contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L^{-1} , NH_4 , K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L^{-1} (A), e amostra de fertilizante sólido contaminada com TI em 6 mg L^{-1} (B).97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Limites de detecção (valores médios) para cátions nos modos de detecção usados em CE. *Fonte JAGER & TAVARES, 2001.*36
- Tabela 2** – Raio iônico hidratado (Å) dos íons catiônicos estudados. Fontes: DAL BOSCO et al., 2004; KIM et al., 2006; SHINZATO, 2007; ALMEIDA et al., 2010.64
- Tabela 3** – Constantes de formação ($\log K_f$) dos complexos metálicos dos cátions estudados com ácido cítrico. *Fonte: ^aNESTERENKO et al., 2008; ^bMcGRAW-HILL (Handbook), 2004.*72
- Tabela 4** – Condições experimentais otimizadas para determinação dos 14 analitos inorgânicos.80
- Tabela 5** – Comparação dos modos de *sample stacking* empregados. Aumento de área, em porcentagem (%), para cada analito em função da condição empregada na pré-concentração (potencial aplicado (-kV) *versus* tempo (segundos)).82
- Tabela 6** – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), sem e com pré-concentração, para os cátions estudados.85
- Tabela 7** – Faixa linear de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), tempo de migração médio (T_m médio) para os cátions estudados.87
- Tabela 8** – Concentrações dos cátions encontrados nas amostras de plantas, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.90
- Tabela 9** – Concentrações dos cátions encontrados na amostra do fitoterápico *Pholia magra*, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.92
- Tabela 10** – Concentrações dos cátions encontrados nas amostras dos fertilizantes sólido e líquido, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.95
- Tabela 11** – Limites de quantificação para as amostras de fertilizante sólido e líquido, comparados a legislação do MAPA.98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

| | |
|-----------------------|---|
| CE | Eletroforese capilar |
| CZE | Eletroforese capilar de zona |
| C⁴D | Detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada |
| MS | cido 2-N-morfolinoetanossulfônico |
| His | Histidina base livre |
| HIBA | cido 2-hidróxiisobutírico |
| HLac | cido ltico |
| ACN | Acetonitrila |
| MeOH | Metanol |
| EtOH | Etanol |
| CD | Detecção condutométrica |
| UV-Vis | Detecção ultravioleta-visível |
| V_{pp} | Voltagem pico a pico |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 22 |
| 2.1 Eletroforese capilar (CE), princípios e teoria..... | 22 |
| 2.2 Mecanismos de separação..... | 27 |
| 2.2.1 Eletroforese capilar em solução livre, CZE..... | 27 |
| 2.2.2 Eletrocromatografia micelar, MECC..... | 28 |
| 2.2.3 Eletroforese capilar em gel, CGE..... | 29 |
| 2.3 Separação eletroforética para cátions inorgânicos..... | 29 |
| 2.3.1 Escolha do eletrólito de trabalho..... | 29 |
| 2.3.2 Aditivos do eletrólito de trabalho e mecanismos de complexação..... | 30 |
| 2.4 Instrumentação básica para CE..... | 34 |
| 2.5 Detecção em CE..... | 35 |
| 2.6 Técnicas de pré-concentração <i>on-line</i> em CE..... | 39 |
| 2.6.1 <i>Stacking</i> mediado por força iônica..... | 40 |
| 2.6.2 <i>Stacking</i> em campo amplificado..... | 41 |
| 2.7 Características dos metais estudados..... | 42 |
| 2.8 Características das amostras analisadas..... | 45 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| 3.1 Instrumentação | 47 |
| 3.1.1 Visão geral e descrição equipamento CE-C ⁴ D construído | 47 |
| 3.2 Reagentes, soluções e amostras..... | 56 |
| 3.3 Procedimentos analíticos | 57 |
| 3.3.1 Eletrólito de trabalho, soluções padrões e preparo de amostras..... | 57 |
| 3.3.2 Condicionamento do capilar de sílica..... | 58 |
| 3.3.3 Controle de contaminação externa e materiais de uso..... | 58 |
| 3.4 Tratamento dos dados experimentais e figuras de mérito..... | 59 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 61 |

| | |
|--|------------|
| 4.1 Otimização das separações eletroforéticas | 61 |
| 4.1.1 Otimização da composição do eletrólito de trabalho | 61 |
| 4.1.2 Otimização dos parâmetros operacionais..... | 77 |
| 4.1.3 Otimização das estratégias de pré-concentração da amostra..... | 80 |
| 4.2 Avaliação do método analítico..... | 84 |
| 4.3 Aplicação analítica..... | 89 |
| 4.3.1 Amostras de plantas medicinais..... | 90 |
| 4.3.2 Amostra de fitoterápico..... | 92 |
| 4.3.3 Amostras de fertilizante sólido e líquido..... | 94 |
| 5 CONCLUSÃO | 100 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |

1 INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 1990, a separação de íons metálicos é umas das áreas de pesquisa em eletroforese capilar (CE, *capillary electrophoresis*) que se desenvolve mais rapidamente (TIMERBAEV, 1997). É uma técnica extremamente útil para separar compostos iônicos ou ionizáveis, devido à sua alta eficiência de separação (MORAES *et al.*, 2009).

A determinação de cátions inorgânicos, como os alcalinos, alcalinos terrosos, íon amônio (NH_4^+) e metais de transição são de grande importância para o meio ambiente, para a medicina e as análises farmacêuticas (QU *et al.*, 2004). Cátions metálicos dos grupos IA e IIA tem um importante papel em inúmeros processos no corpo humano, tal como volume e regulação osmótica, ritmo do miocárdio, coagulação sanguínea e como co-fatores na ativação enzimática. A determinação de concentrações anormais desses íons pode levar a diagnósticos de desordens metabólicas, como diabetes e desordens cardíacas (SILVA *et al.*, 2003). Também a determinação simultânea dos íons potássio e amônio é importante na agricultura, e em amostras de alimentos e de águas em geral (FRANÇOIS *et al.*, 1995). Neste contexto, percebe-se que técnicas analíticas simples, confiáveis e rápidas são necessárias para determinar esses íons em amostras reais (CHIARI, 1998; QU *et al.*, 2004).

Além da alta resolução, a CE oferece curtos tempos de análise, baixo consumo de soluções (KUBAN *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 2005) e adaptabilidade para uma grande variedade de aplicações usando diferentes condições de separação (TIMERBAEV, 1995; QU *et al.*, 2004). Nesta técnica os compostos são separados com base na diferença entre as suas mobilidades aparentes, que são relacionadas com a razão carga/raio iônico, e a fatores estruturais (SHI & FRITZ, 1993; TIMERBAEV, 1995; JAGER & TAVARES, 2001). Trata-se de uma técnica instrumental de análise que utiliza essencialmente capilares de sílica fundida, onde a separação é conduzida nesses tubos, preenchidos com uma solução de eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico (TAVARES, 1997; JAGER & TAVARES, 2001).

Um dos problemas na análise de compostos inorgânicos, como os metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição por CE é que eles apresentam mobilidades aparentes muito próximas, pela semelhança de seus tamanhos (raios iônicos hidratados) e mesmas cargas, em alguns casos, podendo inviabilizar a separação (FRANÇOIS *et al.*, 1995; TIMERBAEV, 1997; CHIARI, 1998; JAGER & TAVARES, 2001). Sendo assim, é necessário o uso de agentes complexantes a fim de se obter uma separação completa dos analitos, modificando seletivamente a mobilidade dos íons e melhorando a resolução (separação) entre eles (SHI & FRITZ, 1993; TIMERBAEV, 1995; TIMERBAEV, 1997; TANYANYIWA & HAUSER, 2002; SILVA *et al.*, 2003). Em algumas situações, solventes orgânicos também têm sido adicionados ao eletrólito para melhorar a seletividade da separação dos íons metálicos (JAGER & TAVARES, 2001; QU *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2009).

A detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D, *capacitively coupled contactless conductivity detection*) vem ganhando espaço como alternativa à detecção condutométrica convencional, suprimindo suas principais desvantagens; além de oferecer sensibilidade superior à detecção fotométrica por absorção no UV-Vis (Ultravioleta-visível) (SILVA *et al.* 2002; TAN *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, algumas técnicas e estratégias de pré-concentração *on-line* vêm sendo desenvolvidas. Sem afetar a eficiência da separação e sendo usualmente adaptadas para a análise de traços (quantidades “traço” dos analitos, ou seja, muito pequenas), essas técnicas de pré-concentração tem recebido cada vez mais atenção por parte dos pesquisadores (TAN *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2009). Essas estratégias podem concentrar os analitos utilizando um único método de injeção antes da separação e diminuir o requisito para a sensibilidade dos detectores (JUN *et al.*, 2007).

A manipulação da seletividade da separação de íons em CE pode ser também facilmente obtida pelo ajuste do pH do eletrólito, pela alteração da força iônica do eletrólito e através da adição de substâncias especiais, como agentes complexantes e/ou solventes (QUIRINO & TERABE, 2000). Enfim, com variações de parâmetros e características do sistema eletroforético utilizado, pode obter-se a condição ideal para a separação de todos analitos desejados.

Evidentemente, a escolha dos parâmetros experimentais que podem ser variados para influenciar a seletividade da separação apresenta um desafio especialmente para o início do trabalho do método a ser desenvolvido por eletroforese capilar (TIMERBAEV, 1997).

Tendo em vista a necessidade de determinar metais em diversos tipos de amostras e matrizes, nas mais variadas áreas de pesquisa, e sabendo-se das dificuldades para desenvolver e otimizar um método que permita a separação de vários metais simultaneamente (como alcalinos, alcalinos terrosos e de transição), este trabalho propõe a separação simultânea de 14 analitos, na forma de cátions inorgânicos: amônio (NH_4^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}), tálio (Tl^+), cromo (Cr^{3+}), chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e níquel (Ni^{2+}). Estes cátions foram determinados em eletrólito de trabalho empregando diferentes agentes complexantes para o aumento da seletividade na separação. Os mecanismos de separação dos íons complexados serão explicados com base nos equilíbrios de complexação existentes entre os complexantes e os analitos existentes no meio eletrolítico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Eletroforese capilar (CE), princípios e teoria

O fenômeno da eletroforese pode ser definido como a migração de íons ou partículas carregadas em solução sob influência de um campo elétrico. Diferentes partículas com diferentes cargas e/ou tamanhos, possuem mobilidades diferentes e, portanto, migram através do capilar com velocidades diferentes (KOK, 2000; HARRIS, 2005).

A força elétrica (F_e) exercida sobre um íon (i) em solução é proporcional a carga da partícula (q_i) e a força do campo elétrico (E) aplicado, dada como:

$$F_e = q_i \cdot E$$

Sob influência da força elétrica o íon é acelerado e começa a migrar. A direção desta força é em sentido oposto à carga do íon. Este movimento, por sua vez, é retardado pela força de atrito (F_a), que aumenta com a velocidade (v_i) do íon. Considerando uma espécie metálica iônica uma partícula esférica, segundo a lei de Stokes (onde coeficiente de atrito, $f = 6\pi\eta r$), a F_a pode expressa como:

$$F_a = 6\pi\eta \cdot r_i \cdot v_i ,$$

onde η é a viscosidade da solução e r_i , o raio hidrodinâmico efetivo do íon.

Depois de um curto tempo de aceleração, quando a F_e e F_a se igualam, o íon alcança rapidamente uma velocidade constante de migração:

$$v_i = q_i \cdot E / (6\pi\eta \cdot r_i)$$

Outras forças atuam sobre o íon (Figura 1), associadas à presença da esfera iônica. A força de retardamento ($F_{\text{retardamento}}$) aparece porque a esfera iônica tem carga oposta à do íon; já a força de relaxação ($F_{\text{relaxação}}$) está relacionada à tendência da esfera iônica em se redistribuir simetricamente ao redor do íon. Então, como o íon está em movimento constante, existe um tempo limite para a esfera

iônica se rearranjar. Isso resulta no alongamento da esfera iônica em relação à posição central do íon (KUHN & H.-KUHN, 1993; TAVARES, 1996).

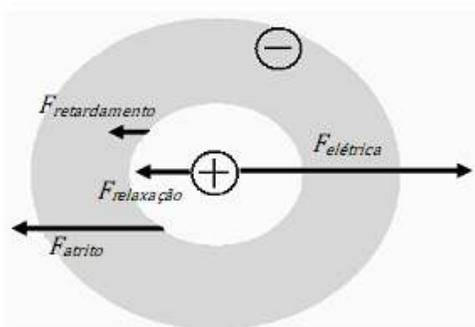


Figura 1: Forças atuantes em um íon e sua esfera iônica durante a migração eletroforética (TAVARES, 1996).

Embora a maioria das moléculas não seja esférica, a lei de Stokes define o raio hidrodinâmico efetivo de uma molécula a partir da sua mobilidade observada. Através do raio hidrodinâmico efetivo, a molécula se comporta como se fosse esférica (HARRIS, 2005).

Em condições normais na eletroforese capilar (CE), as velocidades típicas de migração são na ordem de alguns milímetros de segundo. Onde a mobilidade iônica (μ_i) é definida como:

$$\mu_i = v_i / E$$

Logo, a mobilidade de uma partícula esférica pode ser escrita pela equação:

$$\mu_i = q_i / (6\pi\eta \cdot r_i)$$

Sendo assim, os íons podem ser separados quando diferem em carga (q_i) e/ou em tamanho de raio iônico hidratado efetivo (r_i), ou melhor, quando suas razões carga/raio iônico forem diferentes (KOK, 2000). A mobilidade iônica é conhecida também como mobilidade eletroforética (μ_{ef}). A μ_{ef} é a constante de proporcionalidade entre a velocidade do íon e a intensidade do campo elétrico. A mobilidade é diretamente proporcional à carga do íon e inversamente proporcional ao coeficiente de atrito (f), da lei de Stokes. Como a mobilidade é uma razão (q_i/f), a mobilidade do íon tende a ser menor quanto maior for o raio iônico (HARRIS, 2005).

É no tubo capilar onde acontecem as separações eletroforéticas (Figura 2). Ele é composto por quartzo amorfo (sílica fundida, ou seja, dióxido de silício amorfo) e recoberto por uma camada de material polimérico (poliimida) (DANIELI, 2005). A sílica fundida tem a função de isolamento elétrico e o material polimérico, dá proteção contra choques mecânicos. Geralmente apresenta dimensões internas entre 50 e 75 μm , e externas em torno de 360 μm .

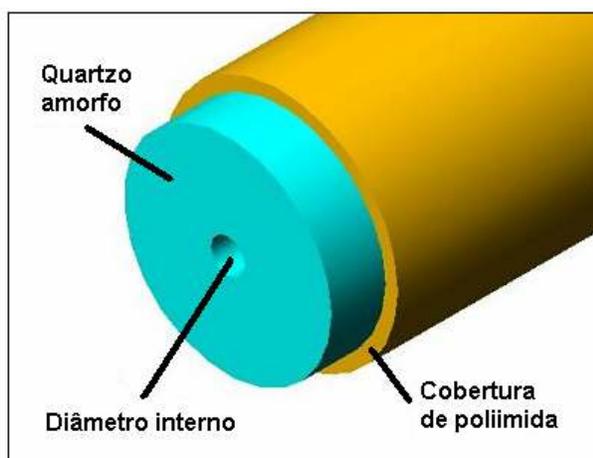


Figura 2: Tubo capilar representado com as camadas que o compõem (DANIELI, 2005).

Na CE a migração das espécies no interior do capilar de separação, preenchido com um eletrólito geralmente com características condutoras e tamponantes, ocorre também pelo efeito do fluxo eletrosmótico (EOF), combinado com a mobilidade eletroforética, que são gerados quando o campo elétrico é aplicado (TAKAYANAGI, 2005).

A parede interna do capilar de sílica fundida é revestida com grupos silanol ($-\text{SiOH}$), com propriedades ácidas (SILVA, 2001). Grupos silanóis livres, nas paredes do capilar são facilmente deprotonados, adquirindo cargas negativas ($-\text{SiO}^-$) ($\text{pH} > 2$). Uma camada de cátions imóvel e fortemente adsorvida, adjacente a superfície negativa, neutraliza parcialmente essa carga negativa, formando uma camada compacta. A carga negativa restante é neutralizada pelo excesso de cátions móveis solvatados, formando uma camada difusa. Então, essas camadas de contra-íons formadas dão origem a uma dupla camada elétrica (KOK, 2000; HARRIS, 2005).

Quando um campo elétrico paralelo à superfície é aplicado, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, e os cátions são atraídos para o cátodo (pólo negativo) e os ânions, para o ânodo (pólo positivo). As cargas negativas da superfície do capilar não se movimentam, já os cátions da camada difusa, fracamente ligados, também migram em direção ao cátodo, arrastando consigo moléculas neutras do solvente. Esse “bombeamento” de cargas e a movimentação de moléculas do solvente pela aplicação de um campo elétrico é chamado de eletrosmose, representado na Figura 3 (KUHN & H.-KUHN, 1993; TAVARES, 1997; SILVA, 2001).

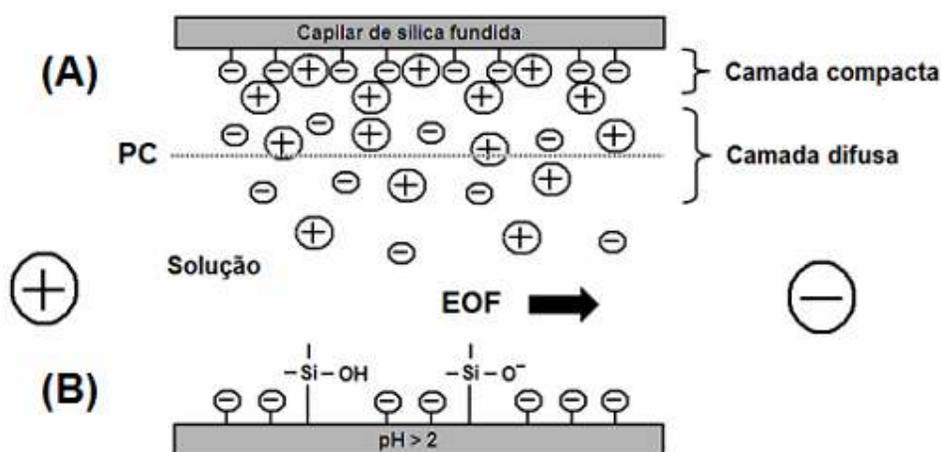


Figura 3: Modelo para interface capilar/solução; onde: (A) dupla camada elétrica, (B) representação da eletrosmose, e PC é o plano de cisalhamento (SPENGLER, 2009).

A velocidade do fluxo do solvente, ou fluxo eletrosmótico (EOF), é proporcional ao campo elétrico aplicado:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E$$

onde a constante de proporcionalidade entre a velocidade eletrosmótica (v_{eo}) e o campo elétrico (E) aplicado é chamada de mobilidade eletrosmótica, μ_{eo} .

A μ_{eo} depende por sua vez da constante dielétrica do meio (ϵ), da viscosidade da solução (η) e do potencial definido no plano de cisalhamento na região difusa, ou potencial zeta (ζ):

$$\mu_{eo} = \zeta \varepsilon / (4\pi\eta)$$

Sendo assim, a mobilidade observada de um íon pode ser dita como mobilidade aparente (μ_{ap}). A μ_{ap} é a soma da mobilidade eletroforética do íon mais a mobilidade eletrosmótica da solução:

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{eo}$$

A eletrosmose apresenta um perfil radial linear, com velocidade uniforme em mais de 99,9% da seção transversal do capilar (Figura 4). Sendo de grande valia, pois evita a dispersão das bandas e garante uma alta eficiência de separação, em comparação a outras técnicas que utilizam pressão para movimentar as soluções, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatography*), e apresentam perfil laminar, ou parabólico, com velocidade maior no centro no tubo (SILVA, 2001; HARRIS, 2005).

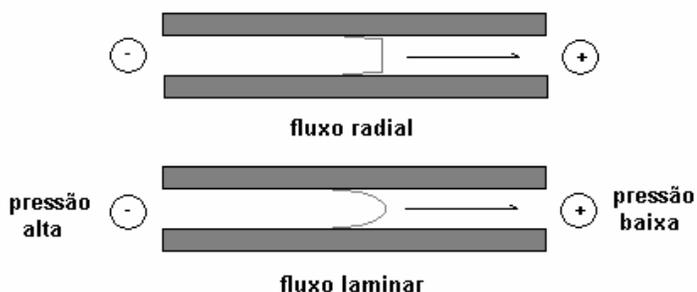


Figura 4: Representação do perfil radial da eletrosmose e do perfil laminar da HPLC. *Adaptado de HARRIS, 2005.*

As separações eletroforéticas é o resultado da soma de efeitos que contribuem, aditivamente, dispersando as zonas dos analitos. O EOF uniforme contribui para a alta resolução da eletroforese capilar. Portanto, qualquer efeito que diminua a sua uniformidade, pode criar um alargamento de banda dos analitos e diminuir a resolução. Por exemplo, o fluxo de íons no capilar gera calor (conhecido como efeito Joule). A viscosidade é menor na região mais quente, o que perturba o perfil eletrosmótico uniforme do fluido. Nesse caso, o capilar tem destaque por ser

suficientemente fino para dissipar o calor rapidamente. Os gradientes de temperatura também perturbam o fluxo e reduzem a resolução.

Outros fatores possíveis e que costumam dispersar as zonas e afetar a resolução, além do efeito Joule, são: a difusão, geralmente associada à temperatura; a adsorção, dos analitos nas paredes do capilar; a dispersão, geralmente associada ao processo de transporte de carga (KUHN & H.-KUHN, 1993). Obviamente, sempre se trabalha com o intuito de minimizar esses efeitos, otimizando as melhores condições experimentais para a separação eletroforética dos analitos em estudo, como por exemplo a composição e o pH do eletrólito de trabalho, a temperatura de trabalho, uso de agentes complexantes e/ou modificadores orgânicos, entre outros parâmetros operacionais, conforme a necessidade exigida particularmente por cada método desenvolvido.

2.2 Mecanismos de separação

2.2.1 Eletroforese capilar em solução livre, CZE

A eletroforese capilar em solução livre, também conhecida como eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*), é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em virtude da facilidade de sua implementação e de sua otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997).

Na prática o capilar é preenchido com o eletrólito de trabalho e a amostra é introduzida como uma pequena banda no capilar. Com a aplicação do potencial de separação, os diferentes componentes da amostra vão se separando, conforme suas mobilidades aparentes, em zonas distintas (Figura 5) (KUHN & H.-KUHN, 1993). Embora não exista restrição de mobilidade entre o analito e co-íon do eletrólito essa relação é determinante para o formato dos picos obtidos, influenciando também na sensibilidade em alguns casos particulares (SILVA, 2001).

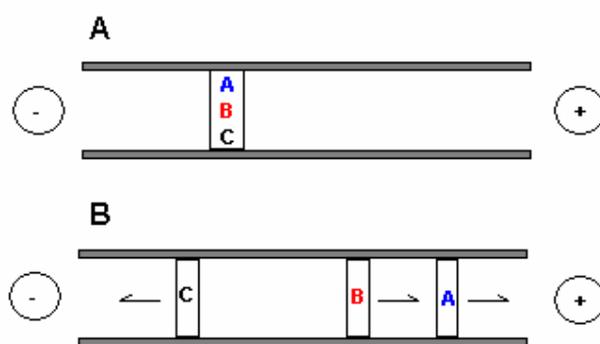


Figura 5: Princípio da CZE; onde (A) é o estado inicial e (B) migração diferenciada das zonas distintas dos analitos. *Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.*

Uma limitação primária dos métodos eletroforéticos em solução livre é a impossibilidade de separar compostos neutros, a menos que existam diferenças significativas de massa molecular. Compostos neutros, em geral, migram no capilar por ação exclusiva do fluxo eletrosmótico (EOF), não havendo discriminação espacial e/ou temporal dos solutos na chegada do detector.

2.2.2 Eletrocromatografia micelar, MECC

A eletrocromatografia micelar (MECC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*) separa moléculas neutras ou íons. Nessa técnica, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de trabalho, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases.

Uma fase é representada pelo eletrólito, transportada eletrosmoticamente sob ação do campo elétrico, e a outra fase é pelas micelas, fase pseudo-estacionária, transportada pela combinação de eletroforese e da eletrosmose. A separação se dá basicamente pela partição diferenciada dos solutos neutros entre as duas fases, o eletrólito e a micela (TAVARES, 1997; KOK, 2000; SILVA, 2001; HARRIS, 2005).

2.2.3 Eletroforese capilar em gel, CGE

A eletroforese capilar em gel (CGE, *capillary gel electrophoresis*) tem sido exaustivamente usada na separação de compostos de caráter iônico e de alta massa molecular. Nesse mecanismo, os solutos migram, através de uma estrutura polimérica, sendo mais ou menos impedidos em seu percurso, de acordo com seu tamanho, processo este conhecido como “peneiramento”. As moléculas menores migram mais rapidamente que as moléculas maiores através da rede polimérica emaranhada.

Os géis são geralmente géis químicos, de estruturas porosas, nos quais existem ligações químicas entre cadeias, fazendo com que tenham ligações cruzadas. Geralmente trata-se de um componente fluido, imobilizado em uma rede polimérica (TAVARES, 1997; KOK, 2000; HARRIS, 2005).

Além destes mecanismos citados, CZE, MECC e CGE, existem a focalização isoelétrica capilar (CIEF, *capillary isoelectric focusing*) e a isotacoforese capilar (CITP, *capillary isotachopheresis*), os quais suas teorias podem ser melhores explicadas e compreendidas na bibliografia da área (KUHN & H.-KUHN, 1993; TAVARES, 1997; KOK, 2000).

2.3 Separação eletroforética para cátions inorgânicos

2.3.1 Escolha do eletrólito de trabalho

A dificuldade encontrada na otimização da separação de vários cátions metálicos é causada, geralmente, por que estes apresentam valores de condutância equivalente similares, conseqüentemente, mobilidades iônicas muito próximas, inviabilizando a separação eletroforética (JAGER & TAVARES, 2001). Além de apresentarem, em alguns casos, tamanhos similares de raio iônico hidratado e cargas idênticas. É importante destacar que a mobilidade aparente dos íons sob um campo elétrico é influenciada não apenas pela sua carga, massa e dimensões físicas, mas também por interações com os componentes do eletrólito de trabalho

(CHIARI, 1998). Portanto a escolha do eletrólito de trabalho é um fator crucial para o desenvolvimento da separação eletroforética de cátions.

As propriedades desejáveis para um sistema tampão incluem, além de características condutoras e tamponantes, a baixa mobilidade, para minimizar a geração de calor por efeito Joule. Além disso, a escolha do eletrólito está vinculada a considerações sobre a forma da banda: via de regra, tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do soluto previnem distorções no perfil da banda e minimizam o seu alargamento (TAVARES, 1997).

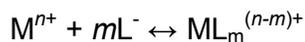
Quando se trata da separação de cátions inorgânicos e metais de transição é comumente usada, como eletrólito de trabalho, a solução composta pelo ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (tampão MES) (ácido fraco) e pela histidina base livre (His) (base fraca). A mistura MES/His, além de formar um sistema tampão, apresenta baixa condutividade e em alta força iônica (KUBAN *et al.*, 2002; TANYANYIWA & HAUSER, 2002; SILVA *et al.*, 2003; KUBAN & HAUSER, 2008). Uma reação de complexação frequentemente acontece entre íons de metais de transição e os eletrólitos orgânicos (por exemplo, o sistema MES/His), auxiliando na separação devido a mudanças nas mobilidades aparentes dos íons (WANG *et al.*, 2007).

De forma geral, os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao seu pK, mais ou menos um (MES pK 6,2; His pK₁ 1,6, pK₂ 6,0 e pK₃ 9,1) (TAVARES, 1997; KUBAN *et al.*, 2002). Na escolha das concentrações são considerados efeitos como: altas concentrações podem comprometer a separação, pelo excesso de calor decorrente do efeito Joule; baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede interna do capilar e, assim, levar a distorções e alargamentos de bandas.

2.3.2 Aditivos do eletrólito de trabalho e mecanismos de complexação

Quando a separação dos íons não é obtida apenas na presença do eletrólito de trabalho, como MES/His, por exemplo, é aconselhável a incorporação de agentes complexantes (solúveis em água) ao eletrólito para modificar a seletividade e melhorar a resolução (CONRADI *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2003).

A modificação da mobilidade aparente de um cátion através da adição de um complexante ocorre pela formação de um complexo metálico de carga e/ou tamanho distintos em relação ao cátion livre. O cátion livre e o complexo formado estão em equilíbrio, como mostra a equação:



onde M é o cátion livre, L é o agente complexante, n é a carga do cátion e m é o número de ligantes do complexo.

A separação em CZE de metais por complexação pode ser agrupada de duas maneiras. A primeira é a adição de um agente complexante fraco (por exemplo, um ligante monoprótico, L^{-}) ao eletrólito de trabalho para obter maiores diferenças nas mobilidades aparentes dos íons. Isso ocorre pela complexação do íon metálico em diferentes extensões. Íons que são complexados em maior grau (maior constante de formação, K_f) movem-se mais lentamente através do capilar que aqueles cuja fração do íon complexado é menor (menor constante de formação, K_f). Nesse caso utiliza-se, por exemplo, o ácido 2-hidróxiisobutírico (HIBA) e o ácido láctico (HLac) (TIMERBAEV, 1995; CHIARI, 1998; PADARAUSKAS *et al.*, 1998; KUBAN *et al.*, 2002; NESTERENKO *et al.*, 2008). Outra alternativa é a adição de um agente complexante forte (por exemplo, um ligante poliprótico, L^{4-}) para ajustar a seletividade. A complexação é baseada na conversão completa do íon metálico livre na forma de um complexo estável carregado negativamente (por exemplo, ML^{2-}), como a maioria dos compostos quelatos, formados com o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (PADARAUSKAS *et al.*, 1997; KUBAN *et al.*, 1999).

Se o equilíbrio é atingido, a espécie livre e a complexada não podem ser separadas, e o eletroferograma deste sistema metálico apresentará um único sinal, relativo às duas espécies em solução (Figura 6) (FRANÇOIS *et al.*, 1995; TIMERBAEV, 1995; CONRADI *et al.*, 1996; JAGER & TAVARES, 2001).

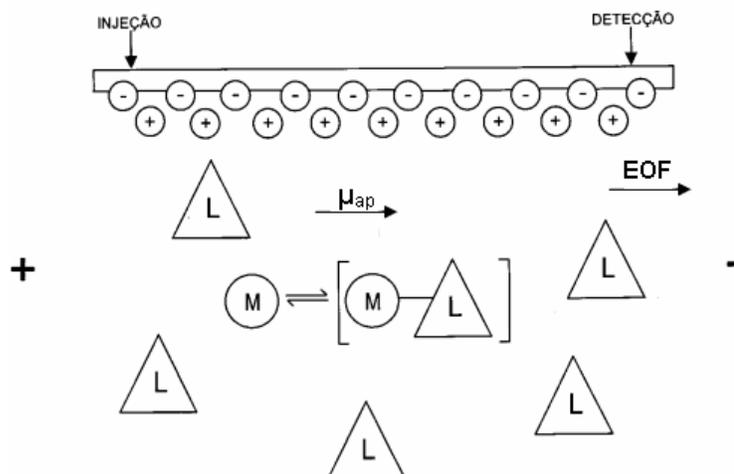


Figura 6: Esquema simplificado da reação de complexação de uma espécie cationica, com o pólo positivo na extremidade da injeção. Representados o complexante (L), o cátion (M), a direção do fluxo eletrosmótico (EOF) e a direção da mobilidade aparente do complexo (μ_{ap}) em equilíbrio. *Adaptado de JAGER & TAVARES, 2001.*

A constante de formação ($K_f = [ML^+] / [M^+].[L]$) do complexo influencia diretamente a variação da mobilidade do cátion. Uma vez que a maioria dos ligantes são ânions derivados de ácidos fracos, a concentração do ligante e o pH também alteram a mobilidade aparente do cátion, e quando estes fatores são otimizados em conjunto, é possível efetuar a análise de vários cátions simultaneamente (KUHNS & H.-KUHNS, 1993; TAVARES, 1997; TIMERBAEV, 1997; JAGER & TAVARES, 2001).

Outros agentes complexantes auxiliares podem ser utilizados como aditivos. O éter 18-coroa-6, em especial, forma complexos de inclusão (ou inserção) com alguns cátions inorgânicos. Trata-se de um mecanismo especial de complexação onde a estabilidade do complexo formado depende da compatibilidade entre o tamanho da cavidade interna da molécula de éter 18-coroa-6 e o raio iônico hidratado do cátion (Figura 7) (OEHRLE, 1996). Poliéteres macrocíclicos (chamados de éteres coroa) são ligantes multidentados que exibem seletividade para íons metálicos específicos em soluções contendo outros íons quimicamente similares. A solvatação do ligante e do cátion metálico também é influenciada pela capacidade doadora e pela constante dielétrica dos solventes presentes no meio (ESHAGHI & GHOLIZADEH, 2004).

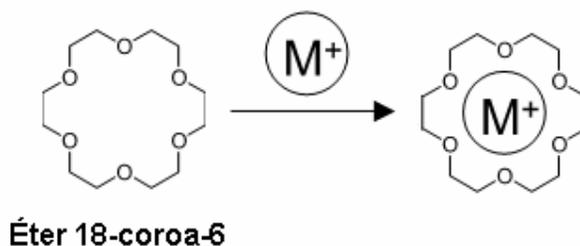


Figura 7: Formação do complexo metal (M^+)/18-coroa-6 (TAKAYANAGI, 2005).

Alguns trabalhos já apresentados na literatura empregam o uso do éter 18-coroa-6 especialmente para separar os íons K^+/NH_4^+ , $Sr^{2+}/Ba^{2+}/Ca^{2+}$ e Na^+/Sr^+ , relacionando o tamanho dos seus raios iônicos hidratados com a cavidade interna da estrutura do éter 18-coroa-6 (TIMERBAEV, 1997; CHIARI, 1998; KUBAN *et al.*, 2002; QU *et al.*, 2004). No entanto, a mobilidade aparente dos demais cátions metálicos em geral não costuma ser significativamente afetada na presença do éter 18-coroa-6 (FRANÇOIS, 1995; WANG *et al.* 2007).

Outra estratégia de aditivos empregada é a utilização de solventes orgânicos, caracterizados por serem agentes modificadores do fluxo eletrosmótico (EOF) e aumentar a seletividade das separações de íons metálicos (TAVARES, 1997; QU *et al.*, 2004). Eles podem afetar as propriedades eletroforéticas do sistema de duas formas, basicamente: mudando a mobilidade aparente do íon e/ou influenciando a força iônica do eletrólito de trabalho (alterando o seu pK) (SARMINI & KENNDLER, 1997).

Solventes orgânicos vêm sendo usados satisfatoriamente no ajuste da seletividade em CE para íons complexados, parcialmente complexados e íons metálicos livres, e os efeitos observados na resolução são atribuídos também a mudanças na solvatação, grau de complexação, carga efetiva e viscosidade do meio. Variações na viscosidade com o uso de solventes são caracterizadas por reduzir a eletrosmose e as velocidades eletroforéticas. Geralmente o aumento dos tempos de migração dos analitos se deve ao aumento na concentração da proporção de solvente presente no eletrólito, e desse modo as mudanças na migração dos íons podem ser suficientemente pronunciadas para influenciar a separação (KUHN & H.-KUHN, 1993; TIMERBAEV *et al.*, 1996; TIMERBAEV, 1997).

Os solventes orgânicos metanol, etanol e acetonitrila são exemplos empregados em CE (JAGER & TAVARES, 2001; QU *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2009).

2.4 Instrumentação básica para CE

Um aspecto importante é a facilidade de instrumentação na eletroforese capilar. O sistema consiste basicamente em uma fonte de alta tensão, o capilar (geralmente, de sílica fundida), os eletrodos (comumente, de platina (Pt)), um sistema de detecção e um sistema de aquisição de dados (Figura 8) (TAVARES, 1996; SPENGLER, 2009). A fonte de alta tensão é responsável por estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar e é conectada, através dos eletrodos de Pt, a dois reservatórios contendo o eletrólito de trabalho. O capilar possui as extremidades imersas em solução para completar o contato elétrico. A temperatura deve ser mantida constante para minimizar efeitos térmicos. É importante que o sistema esteja isolado eletricamente, em bloco de acrílico, por exemplo, para garantir a segurança do operador.

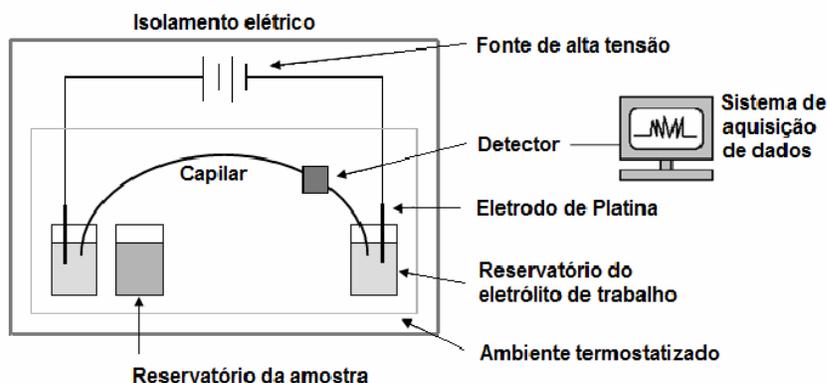


Figura 8: Instrumentação básica para eletroforese capilar.

A introdução da amostra no capilar pode ser feita de duas maneiras: hidrodinamicamente ou eletrocineticamente (Figura 9) (KUHN & H.-KUHN, 1993). Na injeção hidrodinâmica, aplica-se uma pressão negativa ou vácuo em uma das

extremidades do capilar; ou por gravidade, pela elevação de um reservatório em relação a outro, em uma determinada altura (cm) por um tempo (s) estabelecido, onde a amostra é então introduzida no capilar por sifonagem. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do capilar por um tempo determinado (em segundos), forçando os analitos migrarem para o interior do capilar (SILVA, 2001).

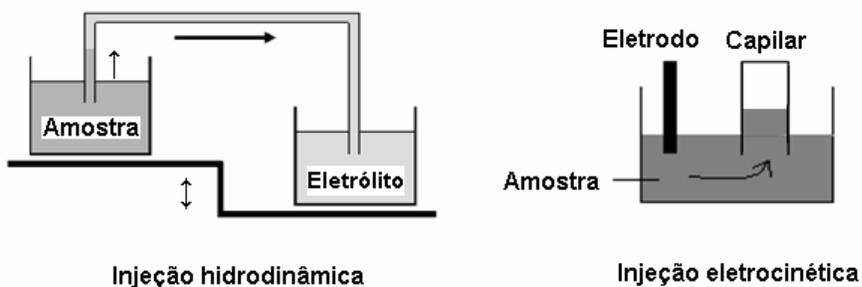


Figura 9: Representação da injeção hidrodinâmica por gravidade e injeção eletrocinética.

2.5 Detecção em CE

Alguns critérios devem ser considerados na escolha do detector para uma análise em particular como sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e ruído. E obviamente, o detector deve atender as necessidades exigidas pelo método eletroforético de trabalho. A resposta do detector deve produzir uma relação conhecida e reproduzível com a concentração dos analitos. Idealmente o detector deve responder de forma independente ao tipo de solução empregada e não deve contribuir para o alargamento das bandas (TAVARES, 1996).

Geralmente os detectores são classificados em universais e específicos. Os universais medem a diferença de alguma propriedade do soluto em relação à solução, como os detectores de índice de refração e de condutividade, entre outros métodos indiretos. Apesar disso apresentam menor intervalo dinâmico e

sensibilidade. Os específicos medem uma propriedade específica do soluto, limitando a detecção, como os detectores de UV-Vis (absorção de luz na região do ultravioleta-visível), de fluorescência, os amperométricos, entre outros.

Deste modo, são divididos basicamente em: métodos ópticos (UV-Vis ou infravermelho, fluorescência, índice de refração, Raman, quimiluminescência); métodos eletroquímicos (amperométricos, voltamétricos, potenciométricos e condutométricos); e outros métodos acoplados ou não (espectrometria de massas e de emissão com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), radiométricos, ressonância magnética nuclear) (SILVA, 2003).

A Tabela 1 mostra os limites médios de detecção típicos para cátions metálicos analisados em sistemas de detecção frequentemente utilizados para eletroforese capilar.

Tabela 1 – Limites de detecção (valores médios) para cátions nos modos de detecção usados em CE. Fonte JAGER & TAVARES, 2001.

| Modo de detecção | Limite de detecção (mol L⁻¹) |
|-------------------------|--|
| Adsorção | |
| direta | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| indireta | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| Fluorescência | |
| direta (Laser) | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| indireta | 10^{-6} |
| Condutividade | $10^{-7} - 10^{-9}$ |
| Amperometria | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| ICP - MS | $10^{-8} - 10^{-10}$ |

Na detecção por UV-Vis, um dos métodos mais difundidos em eletroforese capilar, o feixe de luz simplesmente atravessa uma região do capilar na qual o recobrimento de poliimida é retirado, como se pode ver na Figura 10 (KUHN & H.-KUHN, 1993; SILVA, 2003).

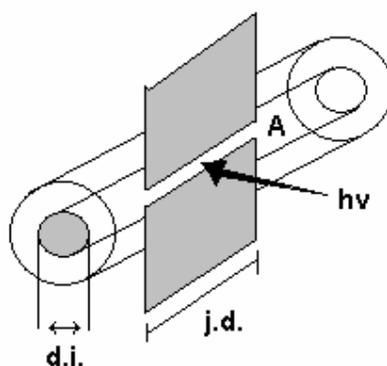


Figura 10: Esquema de detecção utilizando modo UV-Vis; (d.i.) representa o diâmetro interno do capilar; (j.d.), a janela de detecção; (A) abertura da janela de detecção, correspondente ao d.i. do capilar; (hv), luz emitida pela fonte (200 – 900 nm). *Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.*

O modo mais explorado na literatura é a detecção indireta. Nesse modo, é necessário o uso de um reagente derivatizante, com propriedades de absorção no UV-Vis (conhecido como cromóforo catiônico), uma vez que a maioria dos metais não absorve nessa região do espectro (200 – 900 nm) (ZEMANN *et al.*, 1998; JAGER & TAVARES, 2001; KUBAN *et al.*, 2002; ZEMANN, 2003).

O uso de capilares de sílica fundida com diâmetro interno na ordem de micrometros contribui com baixa sensibilidade, quando se trata de detecção por UV-Vis. Isso ocorre devido ao reduzido caminho óptico definido pelo diâmetro interno do capilar (geralmente entre 50 e 75 μm), associado ao pequeno volume de amostra injetado (da ordem de nanolitros) (CHIARI, 1998; MORAES *et al.*, 2009). Assim, a detecção condutométrica (CD, *conductivity detection*) tem demonstrado grande potencial no campo de análises de íons, além de ser um método universal, fornecendo uma boa alternativa para a detecção fotométrica principalmente em baixas faixas de concentração, quando a falta de sensibilidade é a maior desvantagem da detecção UV indireta (POLESELLO & VALSECCHI, 1999; SILVA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2006).

A técnica de CD envolve basicamente a aplicação de um sinal senoidal, voltagem de corrente alternada (AC), da ordem de milhares de hertz (Hz), a dois microeletrodos de platina posicionados sobre o capilar. Então na cela condutométrica, mede-se uma corrente que é propriedade da composição iônica da solução analisada (Figura 11) (KUHN & H.-KUHN, 1993; KOK, 2000; SILVA, 2003).

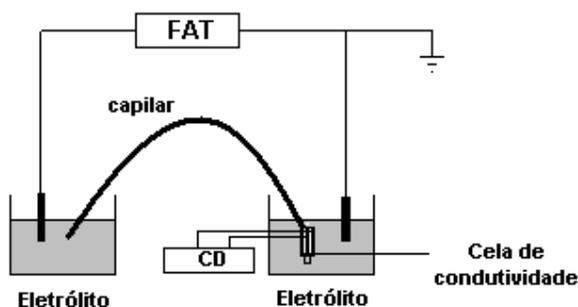


Figura 11: Esquema de detecção utilizando célula condutométrica (CD), onde esta está em contato direto com a solução analisada; (FAT) representa a fonte de alta tensão ligada aos eletrodos de platina. Adaptado de KUHN & H.-KUHN, 1993.

Embora tenha a vantagem de não necessitar de derivatizantes e métodos indiretos de detecção como na detecção UV-Vis (WUERSIG *et al.*, 2006), a principal desvantagem desse esquema é a contaminação e o desgaste dos eletrodos, além de uma possível interferência causada pelos altos potenciais utilizados na separação, o que pode levar a defeitos e a baixa reprodutibilidade do sinal detectado (SOLÍNOVÁ & KASICKA, 2006).

A detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) vem ganhando espaço e atenção como alternativa à detecção condutométrica convencional, suprimindo suas principais desvantagens. Em condições normais a C^4D oferece sensibilidade superior à detecção indireta por absorção no UV-Vis, com a vantagem adicional de não requerer a abertura de janelas no capilar, aumentando a sua durabilidade e facilitando a sua utilização (SILVA *et al.* 2002; SILVA, 2003; JOHNSTON *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009).

Trabalhos pioneiros publicados em 1998 por Silva e do Lago, e por Zemann e colaboradores, introduziram este modo de detecção (C^4D) de forma independente. Neste arranjo, a cela de C^4D é baseada em dois eletrodos tubulares, que atuam como capacitores e que circundam o capilar de separação, são posicionados lado a lado ao longo do eixo do capilar. Um espaço (*gap*) de milímetros entre os eletrodos define o volume de detecção, atuando como um resistor (Figura 12) (CHEN *et al.*, 2009).

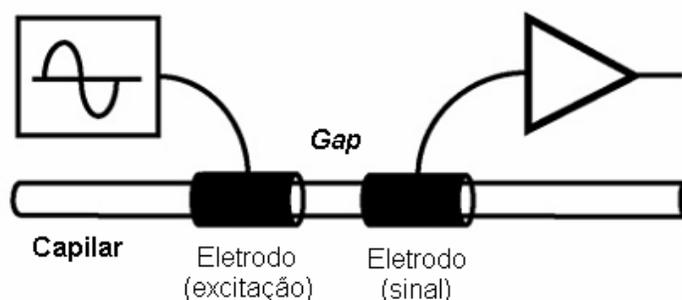


Figura 12: Esquema representativo da célula C^4D , composta pelo capilar, *gap* de detecção, eletrodo de para excitação e eletrodo de registro do sinal resultante. *Adaptado de KUBAN & HAUSER, 2008.*

Um sinal alternado de alta frequência é aplicado na cela de detecção. Como a reatância capacitiva diminui com o aumento da frequência, a impedância do capilar é reduzida, permitindo que variações de condutividade da solução, no interior do capilar, sejam observadas mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo do capilar (POLESELLO & VALSECCHI, 1999; SILVA, 2003; SOLÍNOVÁ & KASICKA, 2006; KUBAN & HAUSER, 2008).

Este arranjo de C^4D , com eletrodos posicionados fora do capilar, como esperado, promove a diminuição de contaminação e de interferências em relação a CD convencional, onde por sua vez os eletrodos são posicionados em contato com as soluções de trabalho (SILVA & LAGO, 1998; ZEMANN *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2009).

2.6 Técnicas de pré-concentração *on-line* em CE

Técnicas de pré-concentração *on-line*, conhecidas como *sample stacking* ou *stacking*, têm sido estudadas para o aumento da sensibilidade na detecção de íons inorgânicos e são baseadas em fenômenos físico-químicos. Usadas para pré-concentrar os analitos, essas técnicas envolvem a manipulação da composição da amostra (através da manipulação da velocidade eletroforética do analito) e do eletrólito de trabalho, juntamente com procedimentos de injeção simples, sem necessidade de alterar a instrumentação presente, pois são realizadas no próprio

capilar durante a análise (JAGER & TAVARES, 2001; JUN *et al.*, 2007; SIMPSON Jr. *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009).

Neste trabalho estão descritos 2 modos de se realizar as técnicas de pré-concentração *on-line*, incluindo: *stacking* mediado por força iônica e *stacking* em campo amplificado.

2.6.1 *Stacking* mediado por força iônica

No *stacking* mediado por força iônica, um grande volume de amostra, preparada em solvente menos condutor que o eletrólito (ou água), é introduzido hidrostáticamente no capilar (Figura 13 A). Após a aplicação do potencial, esta região de baixa condutividade apresentará um campo elétrico (E) maior que a região do eletrólito de trabalho no restante do capilar, devido sua alta resistividade. Os íons presentes na banda de amostra são acelerados nessa região de baixa condutividade, então tendem a se mover em direção à região de maior condutividade. Quando os íons alcançam a interface entre a banda de amostra (alto E local) e a banda de eletrólito de trabalho (baixo E local), eles são desacelerados, causando uma contração na banda de amostra (Figura 13 B), provendo uma região mais estreita e de concentração maior que a banda da amostra original (Figura 13 C) (QUIRINO & TERABE, 2000; JUN *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009).

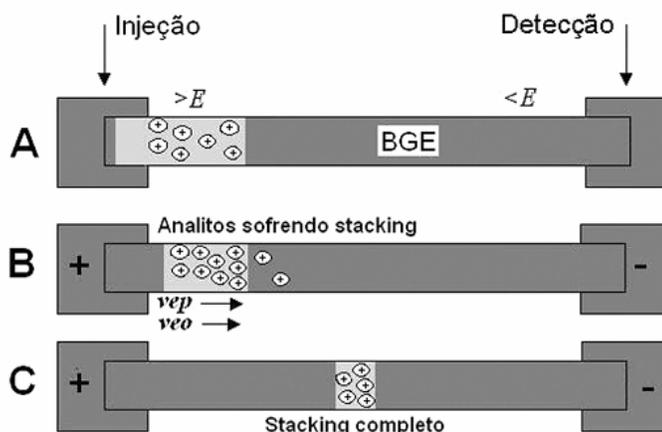


Figura 13: Esquema representativo do *stacking* mediado por força iônica; onde E representa o campo elétrico; v_{ep} , a velocidade eletroforética; v_{eo} , a velocidade eletrosmótica; BGE, o eletrólito de trabalho (MORAES *et al.*, 2009).

Na prática, a amostra é dissolvida em água ou em eletrólito de trabalho (10 vezes diluído). Posiciona-se o reservatório de amostra, no lado da injeção, e o reservatório de eletrólito de trabalho, no lado da detecção, ambos em contato com as extremidades do capilar. Eleva-se a extremidade do capilar em contato com a amostra, a uma altura e um tempo determinados, para a injeção da mesma. Em seguida, troca-se o reservatório de amostra, no lado da injeção, por outro reservatório contendo o eletrólito de trabalho. Aplica-se o potencial definido para o *stacking* por alguns segundos. E por fim, aplica-se o potencial de separação (KUHN & H.-KUHN, 1993; LOPES *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2010).

Contudo, na presença de grandes diferenças de concentrações entre as duas bandas, da amostra e do eletrólito de trabalho, pode ocorrer alargamento das bandas pré-concentradas devido ao fluxo laminar. Porém, esta perturbação sobre o *stacking* é muito pequena devido à alta velocidade dos íons da amostra na banda de injeção (MORAES *et al.*, 2009).

2.6.2 *Stacking* em campo amplificado

No *stacking* em campo amplificado, a amostra também é preparada em um solvente menos condutor que o eletrólito de trabalho, mas é injetada eletrocineticamente, aplicando-se um potencial negativo, na extremidade da detecção no caso de cátions. Antes da introdução da amostra, uma banda (*plug*) de água é introduzida hidrodinamicamente no capilar para garantir as condições de *stacking* em campo elétrico elevado (Figura 14 A). Quando o potencial é aplicado, a banda de água apresenta um alto campo elétrico (E), os íons migram através da banda da amostra e são acelerados na região da banda da água. Quando os íons ultrapassam o limite entre a banda de água e o eletrólito de trabalho, encontram um E menor e são desacelerados, concentrando-se em uma banda fina (Figura 14 B), no limite das regiões da água e do eletrólito. Assim que os campos elétricos são igualados, os íons podem ser separados normalmente (Figura 14 C) (QUIRINO & TERABE, 2000; MORAES *et al.*, 2009).

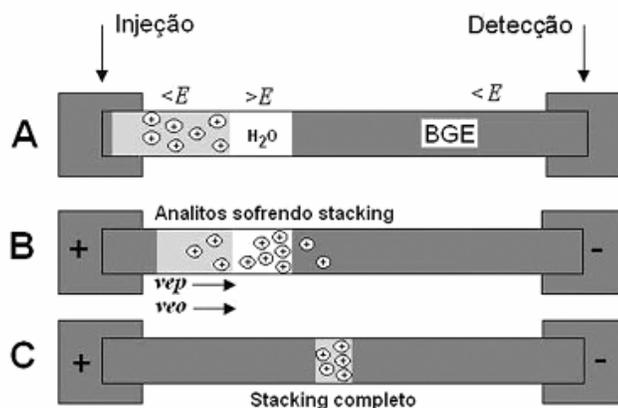


Figura 14: Esquema representativo do *stacking* em campo amplificado; onde E representa o campo elétrico; v_{ep} , a velocidade eletroforética; v_{eo} , a velocidade eletrosmótica; BGE, o eletrólito de trabalho (MORAES *et al.*, 2009).

2.7 Características dos metais estudados

No organismo humano, elementos essenciais são aqueles fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção da vida, por participarem dos processos bioquímicos do corpo. Deficiência e ausência desses elementos na dieta podem gerar as chamadas patologias carenciais. Por outro lado, o excesso destes pode desencadear processos de intoxicações agudas e/ou crônicas. Os elementos não essenciais são aqueles que não apresentam funções definidas ao organismo e geralmente apresentam efeitos tóxicos. Obviamente a toxicidade está relacionada com as quantidades ingeridas e os graus de exposição dos indivíduos contaminados. O grau de toxicidade também está relacionado com o estado nutricional, o metabolismo individual e a capacidade de detoxicação de cada indivíduo (BERTAGNOLLI, 2008).

De modo geral, os metais podem ser classificados como:

- Elementos essenciais e/ou micronutrientes: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio;

- Elementos não essenciais e/ou microcontaminantes, metais pesados: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio;
- Elementos essenciais e simultaneamente microcontaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel.

O sódio (Na) é um elemento biológico essencial aos animais superiores, estando presente em quantidades significativas nos seres vivos, em particular no meio extracelular. O transporte de íons Na^+ através das membranas celulares, a regulação da pressão osmótica dentro da célula, a transmissão de impulsos nervosos através do mecanismo “bomba de Na” e outras funções eletrofisiológicas são devido à diferença na relação de concentrações sódio/potássio nos fluidos intercelulares e extracelulares. O sódio tem ainda um papel importante nas contrações musculares e na absorção de nutrientes pelas células.

Como um constituinte indispensável ao crescimento das plantas, o potássio (K) encontra-se em quase todos os tipos de solos. O equilíbrio na quantidade de K^+ é muito importante no ser humano. A sua falta pode resultar em condições de fadiga muscular e depressão.

Relativamente ao ser humano, o magnésio (Mg) encontra-se majoritariamente nos ossos (700 - 1800 ppm), os quais servem como reservatórios deste elemento. Participa na regulação dos fluxos das membranas celulares e como coadjuvante da atividade de algumas enzimas em variados processos enzimáticos. Já o cálcio (Ca) tem papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do esqueleto, bem como em outras funções fisiológicas (MATTIAS, 2006; E-ESCOLA, Instituto Superior Técnico).

O tálio (Tl) não desempenha qualquer função biológica nos seres vivos. Encontra-se presente no corpo humano, normalmente em quantidades inferiores a 0,5 mg, sendo que a maioria deste elemento se encontra a nível dos tecidos, do sangue e dos ossos. É introduzido no organismo através da alimentação. Este elemento é cumulativo no corpo humano. Isso se deve ao fato do Tl^+ ter um raio iônico muito próximo do K^+ , que desempenha importantes funções biológicas, podendo substituí-lo, comprometendo, assim o funcionamento de alguns órgãos e

sendo a principal causa da sua toxicidade. Este elemento é extremamente tóxico e existem também evidências de que é carcinogênico (SCHNEIDER, 2010).

O níquel (Ni) em pequenas quantidades parece ser essencial para os seres vivos, e em particular para os humanos. Embora em algumas espécies de animais pareça estar ligado ao crescimento, o seu papel e metabolismo são pouco conhecidos. As necessidades de ingestão de Ni para os seres humanos são muito pequenas (5 µg/dia). No corpo, o Ni liga-se à albumina, assim é transportado pela corrente sanguínea, podendo acumular-se em alguns órgãos, principalmente nos rins, no fígado e nos pulmões – sendo excretado pela urina (GARMATZ, 2007; E-ESCOLA, Instituto Superior Técnico).

Além de participar na ativação de várias enzimas, o manganês (Mn) tem um papel fundamental na formação da matriz orgânica óssea. Entre as suas principais aplicações industriais estão os fertilizantes e os produtos farmacêuticos (cloreto, óxido e sulfato de Mn) (MATTIAS, 2006; METAIS PESADOS E SEUS EFEITOS TÓXICOS).

O cobalto (Co) está presente na vitamina B₁₂, a deficiência desta vitamina pode causar fadiga crônica, anemia, depressão mental e perdas de sensibilidade. A toxicidade do Co é bastante baixa em comparação com outros metais. A exposição a elevados níveis deste elemento podem causar efeitos na saúde, principalmente sobre os pulmões, como asma e pneumonia (SPENGLER, 2009; ONTARIO, Ministry of The Environment).

Considerado um elemento essencial o zinco (Zn) tem um papel importante na síntese e no metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos e na divisão celular. Em excesso no organismo, o Zn pode complexar-se com a albumina e os sintomas de envenenamento são vômito, náusea, desidratação, letargia e descoordenação muscular (FAVARON, 2004).

O cromo (Cr), mais precisamente o Cr³⁺, é fundamental ao funcionamento do organismo como na manutenção do metabolismo de lipídeos, proteínas e da glicose. Diferentemente, o Cr⁶⁺ é tóxico principalmente por penetrar facilmente na pele (FAVARON, 2004; GARMATZ, 2007).

Na agricultura, uma fonte direta de contaminação pelo cádmio (Cd) é a utilização de fertilizantes fosfatados. O Cd é um elemento de vida biológica longa (10 a 30 anos), apresenta uma excreção lenta pelo organismo humano (atinge primeiramente os rins) e é tóxico mesmo em concentrações muito pequenas (BERTAGNOLLI, 2008; METAIS PESADOS E SEUS EFEITOS TÓXICOS).

Quando se trata de poluição por metais pesados, o chumbo (Pb) é considerado um dos maiores poluentes ambientais. Não se tem conhecimento da função fisiológica deste elemento no organismo humano. Quando ingerido, costuma ser cumulativo. Em níveis baixos, a presença do Pb pode afetar a capacidade do organismo para utilizar cálcio, magnésio, zinco e outros minerais (FAVARON, 2004; MATTIAS, 2006; SPENGLER, 2009).

O cobre (Cu) tem função fundamental na síntese de hemoglobina e participa em uma grande variedade de processos metabólicos críticos. O Cu é muito utilizado em formulações de rações animais. Em geral, este metal não é considerado um elemento cumulativo no organismo e quando ingerido em excesso costuma ser excretado via bile. Os sintomas para toxicidade crônica de Cu são, em geral, úlceras gástricas e problemas renais (FAVARON, 2004; MATTIAS, 2006).

2.8 Características das amostras analisadas

As plantas medicinais analisadas foram a *Persea americana*, popularmente conhecida como abacateiro, e a *Cyperus rotundus*, conhecida como tiririca. A planta *Persea americana* é caracterizada por apresentar propriedades medicinais como antianêmica, antiinflamatória, antioxidante, digestiva, diurética, entre outras. É indicada para problemas de ácido úrico elevado, anemia, amigdalite, estomatite, infecções da bexiga, dor de cabeça, entre outras enfermidades. Pode ser consumida pela infusão com as folhas em água quente, ou seja, na forma de chá, e pode ser adquirida como um fitoterápico, registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A planta *Cyperus rotundus* apresenta propriedades medicinais como fortificante, vermífuga, antidiarréica, afrodisíaca, adstringente, entre outras. É geralmente indicada em casos de inflamações, infecção urinária, dores abdominais, gastralgia e vômitos (PLANTAMED). Pode ser consumida na forma de decocção, ou seja, na forma de chá, em pó ou em cápsulas, como um fitoterápico, registrado na ANVISA.

Fitoterápicos são considerados medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas, segundo a ANVISA. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Das disposições sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, Resolução – RDC No. 14; DOU No. 63, Abril, 2010), além das documentações e requisitos exigidos, testes de pureza e integridade devem estar citados, incluindo pesquisa de metais pesados (Capítulo II, Seção IV, Artigo 10).

O fitoterápico analisado foi a Pholia magra. A Pholia magra é um fitoterápico extraído da planta *Cordia ecalyculata*, possui vários princípios ativos em maior concentração, que atuam como substâncias anorexígenas no tratamento da obesidade. Devido a presença de seus principais constituintes (alantoína, cafeína, potássio, taninos e óleos essenciais), além de ser uma supressora de apetite, a Pholia magra atua como diurético, reduz os depósitos de celulite, pois estimula a circulação e possui ação energizante e cardiotônica (PHARMATIVA).

Fertilizante é definido como sendo toda substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes para as plantas. Podem ser classificados de várias formas, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entre eles estão: fertilizante foliar (líquido), produto que se destina à aplicação na parte aérea das plantas; fertilizante mineral (sólido), produto formado, fundamentalmente, por um composto químico, contendo um ou mais nutrientes de plantas (MAPA, Instrução normativa No. 5/2007). Amostras de fertilizante sólido e líquido (foliar) foram analisadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

O equipamento de eletroforese capilar com detector condutométrico sem contato (CE-C⁴D) utilizado foi construído em laboratório (SPENGLER, 2009; CARVALHO *et al.*, 2009; MARTINI, 2010).

Toda a água utilizada no preparo das soluções passou um processo de destilação, seguido de deionização e, após, purificação em um sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 M Ω cm⁻¹) (Millipore, Bedford, MA, USA).

A massa dos reagentes sólidos foi determinada utilizando uma balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha) com quatro casas de precisão.

As medidas do pH das soluções dos eletrólitos de trabalho foram realizadas em pHmetro digital (Digimed DM 20, São Paulo, Brasil) usando eletrodo de vidro combinado. Para a calibração do equipamento utilizaram-se tampões de calibração de pH 4,01 e pH 7,00 (Digimed), a 25 \pm 1°C.

Para a filtração dos eletrólitos de trabalho utilizou-se membranas de acetato de celulose (poro de 0,45 μ m) (Sartorius, Alemanha). Posteriormente, essas soluções foram sonicadas em sistemas de ultra-som (Unique, São Paulo, Brasi) durante 30 minutos.

Os capilares de sílica fundida de 75 μ m de diâmetro interno (D.I.) e de 360 μ m de diâmetro externo (D.E.) foram obtidos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

3.1.1 Visão geral e descrição do equipamento CE-C⁴D construído

Para a construção do equipamento de eletroforese capilar (CE-C⁴D) desenvolvido em laboratório, tomou-se como referência trabalhos pioneiros publicados por Silva e do Lago (1998) e por Zemann e colaboradores (1998). A Figura 15 a seguir, mostra um diagrama de blocos do equipamento CE-C⁴D com identificação de cada uma das suas partes.

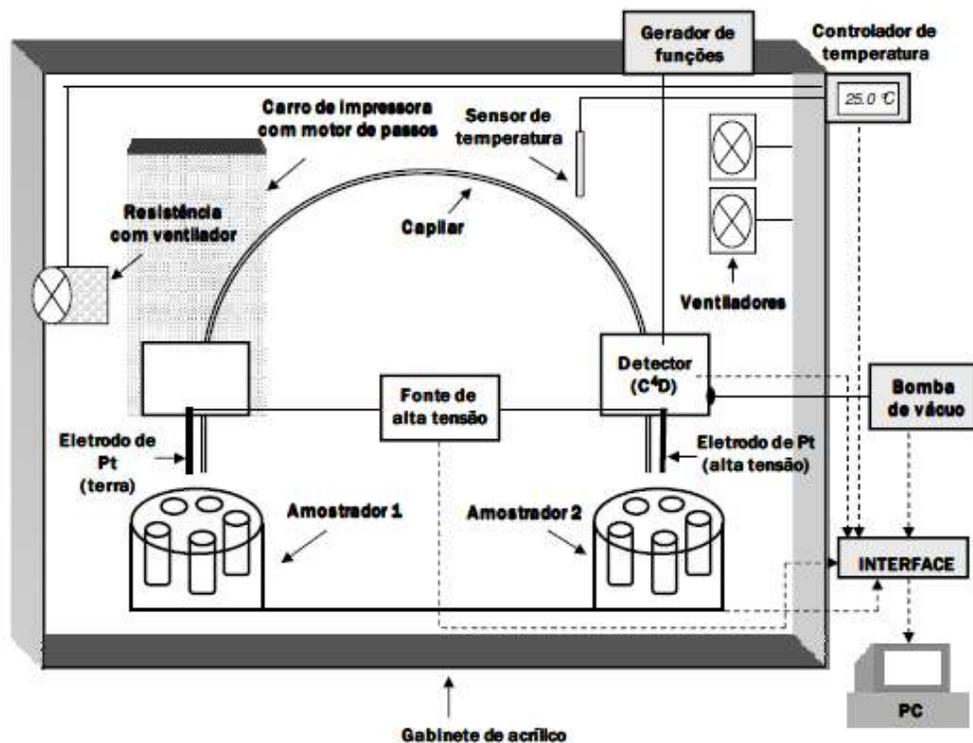


Figura 15: Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO *et al.*, 2009).

Já a Figura 16, mostra o equipamento de CE-C⁴D na sua forma real (foto descritiva), permitindo uma melhor visualização.

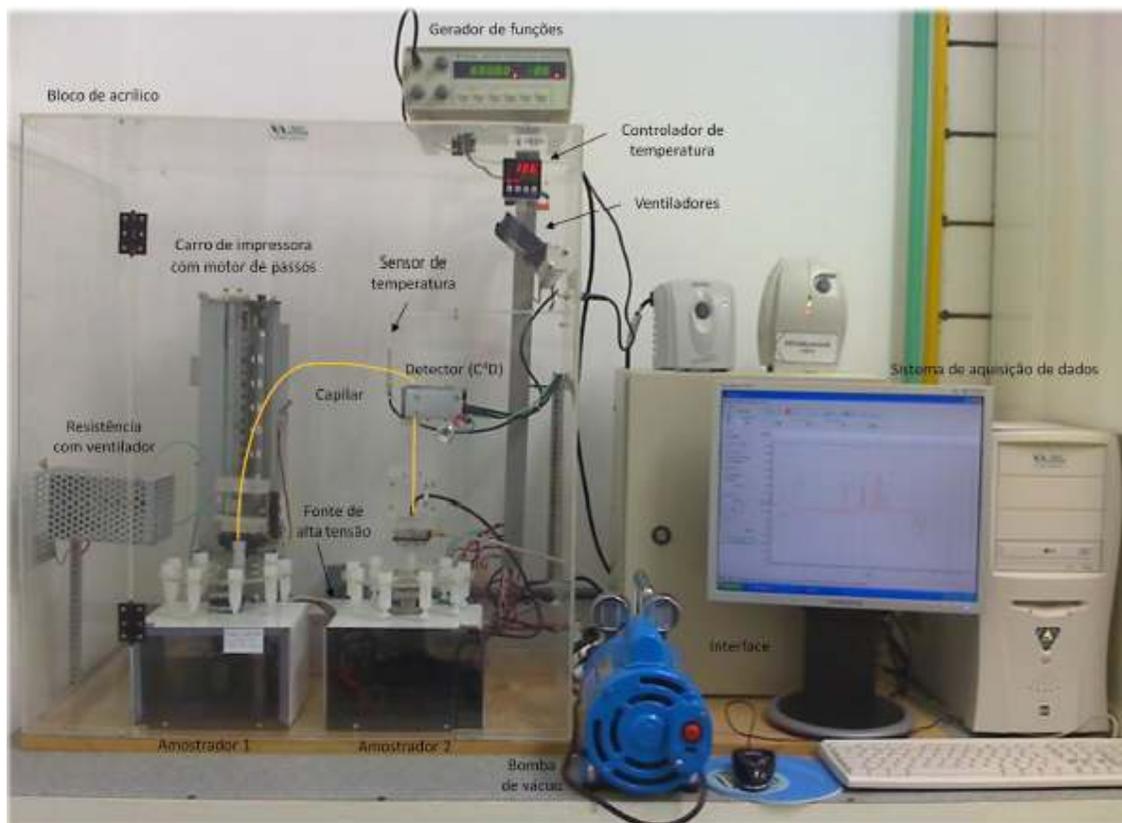


Figura 16: Foto real e descritiva do equipamento de CE-C⁴D construído em laboratório.

Como pode-se observar, o equipamento foi montado em um bloco de acrílico (dimensões de 70 x 80 x 50 cm). Este gabinete de acrílico (transparente) permite a termostatização do ambiente interno do sistema eletroforético e o trabalho seguro do analista, uma vez que a fonte de alta tensão pode aplicar uma diferença de potencial de até ± 30 kV entre os eletrodos de platina (cátodo e ânodo). Neste caso, o capilar apresenta 68 cm de comprimento total, sendo a distância entre o ponto de injeção e o detector (C⁴D) de 46 cm, ou seja, o seu comprimento efetivo.

Com relação à operação básica do equipamento, a Figura 17 mostra as duas extremidades do equipamento contendo duas peças projetadas para a injeção da amostra, a lavagem do capilar e a troca de soluções para a análise eletroforética.

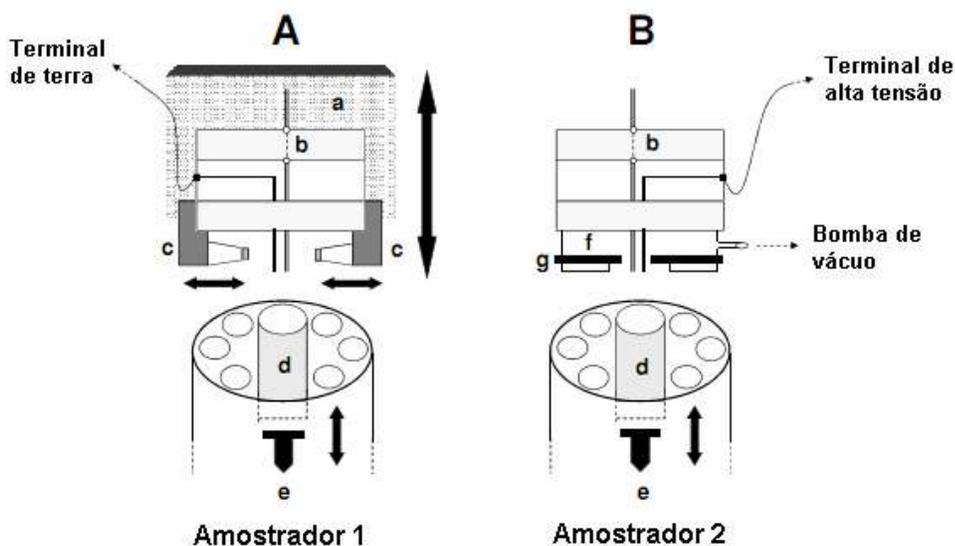


Figura 17: Representação esquemática das peças confeccionadas para o CE-C⁴D; onde (A) injeção hidrodinâmica, (B) lavagem do capilar (aplicação de vácuo) e aplicação de tensão; (a) carro de impressora com motor de passos, (b) guias de silicone para o capilar, (c) garra manipuladora, (d) reservatório da solução, (e) braço eletromecânico, (f) bloco de acrílico para a aplicação de vácuo, (g) borracha sintética para vedação. As setas bilaterais representam os movimentos realizados por cada componente das peças projetadas (CARVALHO *et al.*, 2009).

Com relação à automação do sistema, a interface PCI-1711 utilizada desempenha a função de aquisição do sinal do detector (voltagem) e de operação de todos os componentes do sistema via *software* no computador. As seguintes funções do sistema eletroforético são controladas pela placa da interface: fonte de alta tensão (controle da tensão de saída, monitoramento da tensão e corrente aplicadas, controle de polaridade e habilitação da saída da fonte); bomba de vácuo (liga/desliga); garra manipuladora do sistema de injeção (abre/fecha); altura e tempo de elevação do carro de impressora (*driver* do motor de passos); controlador de temperatura; ventiladores de circulação de ar (liga/desliga); amostradores (*drivers* dos motores de passos). O *software* para operação automatizada do sistema eletroforético através do computador foi desenvolvido em linguagem Delphi 7.0.

O equipamento utiliza um sistema de injeção hidrodinâmica por gravidade, onde uma das extremidades do capilar é elevada até uma determinada altura, por um determinado tempo, fazendo com que um pequeno volume de amostra seja introduzido no capilar. Referente ao lado esquerdo do equipamento, como se pode

ver o conjunto de peças projetadas para a injeção hidrodinâmica da amostra (Figura 17 A).

Os dois amostradores automáticos (Figura 18) são utilizados independentemente, um para o lado da injeção e outro para o lado da detecção. Sendo que cada amostrador é constituído de duas partes: um carrossel, contendo nove reservatórios, e um braço mecânico, através da elevação do reservatório (contendo ou o eletrólito de trabalho ou a amostra) promove o contato das soluções com o capilar e o eletrodo.



Figura 18: Amostradores automáticos construídos para o sistema CE-C⁴D.

Uma fonte de alta tensão (Figura 19) aplica uma diferença de potencial de até ± 30 kV entre o cátodo e o ânodo (eletrodos de platina), ambos mergulhados na solução do eletrólito de trabalho juntamente com o capilar, para as separações eletroforéticas.



Figura 19: Fonte de alta tensão empregada no sistema CE-C⁴D desenvolvido.

O sistema utiliza uma bomba de vácuo para a aplicação de pressão negativa no capilar (-600 mmHg), na extremidade do detector, conforme mostra a Figura 20, para possibilitar a lavagem do capilar.

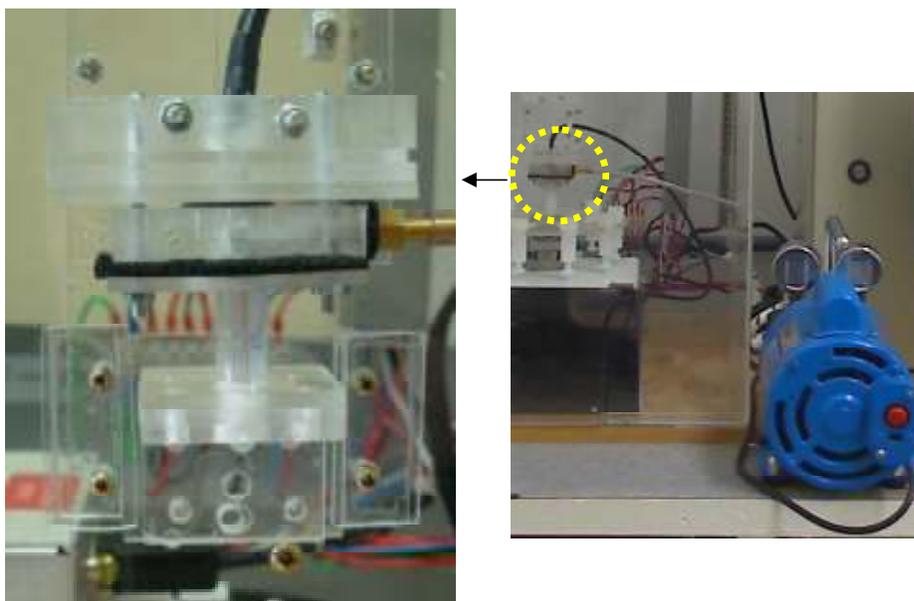


Figura 20: Sistema de lavagem do capilar por aplicação de vácuo.

Para o controle de temperatura, o sistema CE-C⁴D dispõe de um sistema de aquecimento (resistência). Um controlador de temperatura recebe o sinal do sensor (ao lado do detector) (Figura 21 B) e indica a temperatura no painel (*display* digital) (Figura 21 A). Toda vez que a temperatura diminuir em 0,1 °C da temperatura fixada no controlador, a resistência de aquecimento será acionada, retransmitindo a temperatura para a placa de interface em sinal de 0 a 20 mA. Os ventiladores (*coolers*) posicionados na parte superior do bloco de acrílico auxiliam na circulação de ar e na estabilização da temperatura interna.

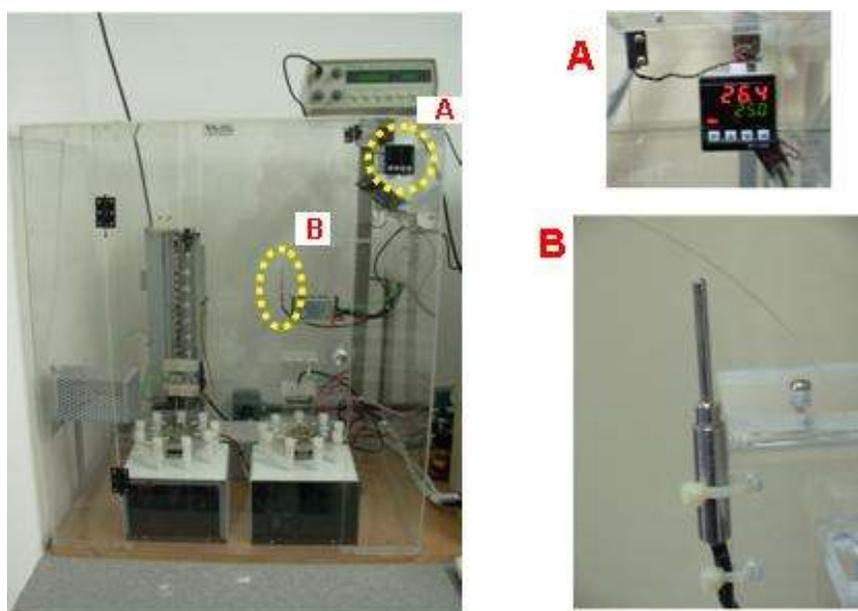


Figura 21: Sistema de controle de temperatura do sistema CE-C⁴D, com *display* digital (A) e sensor de temperatura (B).

Um gerador de funções MFG-4202 (Minipa, São Paulo, SP, BR) (Figura 22) localizado na parte superior do bloco de acrílico é responsável pela aplicação de um sinal de onda senoidal de alta frequência, de 0,2 Hz a 2 MHz, em um dos eletrodos localizados na placa do circuito de detecção, que envolvem o capilar.

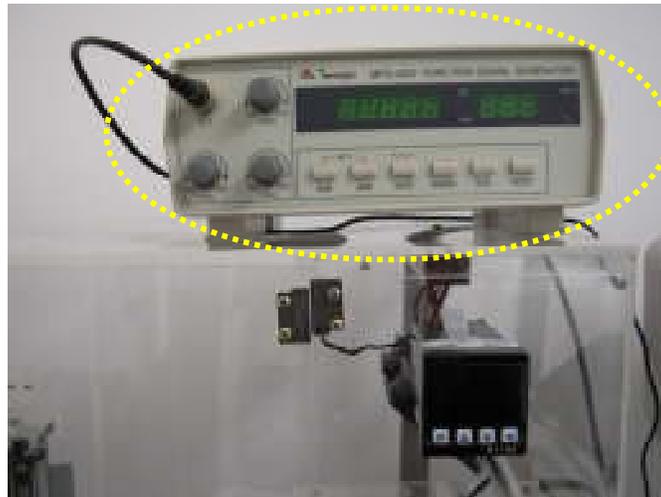


Figura 22: Gerador de funções (onda senoidal) do sistema CE-C⁴D.

O detector de condutividade sem contato, C⁴D (Figura 23), é composto por um conversor de corrente em tensão, retificador com amplificação de 10 vezes, entrada do sinal de alta frequência, eletrodo de aplicação do sinal de alta frequência, eletrodo de detecção, filtro passa-baixas, *buffer* (ganho unitário), correção da linha de base com amplificação de 30 vezes e circuito de proteção para a entrada da placa de interface, conforme mostrado esquematicamente na Figura 24.

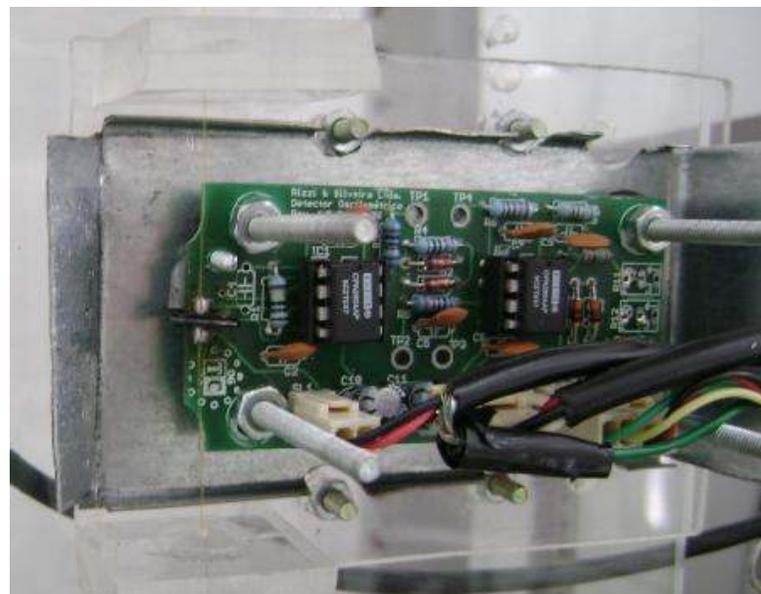


Figura 23: Detector de condutividade sem contato (C⁴D).

A Figura 24 mostra a representação esquemática do circuito de detecção condutométrica sem contato construído e empregado no sistema CE-C⁴D (Carvalho *et al.*, 2009).

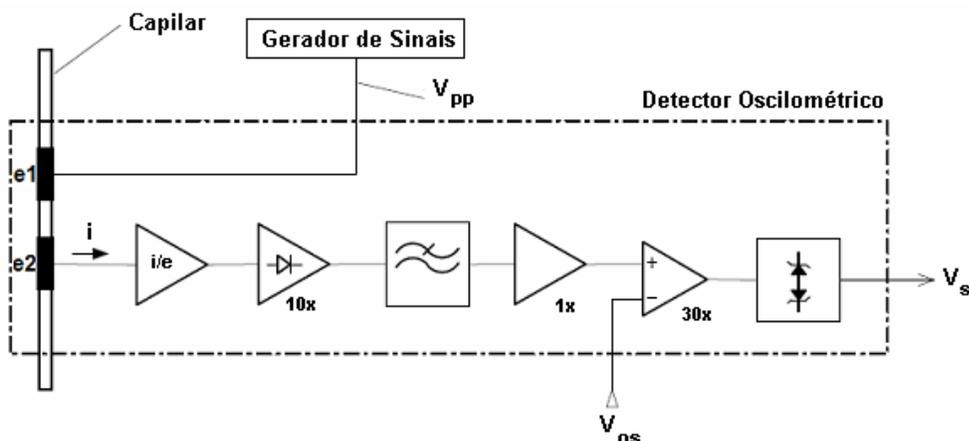


Figura 24: Representação esquemática do detector C⁴D construído para o equipamento de eletroforese capilar, contendo capilar de sílica fundida, eletrodos e amplificadores operacionais.

O *software* utilizado foi modificado para o sistema operar de forma automatizada, além da forma manual, onde se pode selecionar a opção Programa de Análise (forma automatizada no programa) quando desejado.

O programa de análise é composto por uma lista de comandos para o equipamento, sendo estes executados sequencialmente. Todo trabalho diário pode ser programado, e cada corrida é salva em um arquivo nomeado antes de se iniciar o programa. Além disso, podem ser criados vários programas individuais, de acordo com a quantidade de injeções a serem realizadas e a necessidade de cada analista. Quando o programa é iniciado, o operador não realiza mais nenhum comando, sendo todas as etapas realizadas automaticamente pelo programa desenvolvido.

3.2 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e preparados com água ultra-pura, obtida pelo sistema Milli-Q (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) (Millipore, Bedford, MA, USA).

As soluções estoque de sódio, potássio, tálio, cálcio, magnésio, manganês, cromo, chumbo, cádmio, zinco, cobre, cobalto e níquel foram obtidas como padrões certificados do NIST (*National Institute of Standards and Technology*, USA) em uma concentração de 1000 mg L^{-1} (ou 1000 ppm). Apenas a solução estoque de amônio foi preparada a partir do sal cloreto de amônio, NH_4Cl (Merck).

As soluções estoque do eletrólito de trabalho foram preparadas nas concentrações de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ do ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (tampão MES), da Merck (Darmstadt, Germany), de $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ da Histidina base livre (His), da Sigma-Aldrich (USA). O ácido nítrico P.A. (Merck) foi preparado a 20% (v/v), onde foi utilizado para o ajuste de pH do eletrólito de trabalho. Armazenados sob refrigeração (aproximadamente $4 \text{ }^\circ\text{C}$) e ao abrigo de luz.

Os agentes complexantes utilizados nas variações da composição do eletrólito de trabalho foram preparados na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, de Éter 18-coroa-6 (Merck), Ácido Cítrico (HNO_3) (Merck), Ácido 2-hidróxiisobutírico (HIBA) (Sigma-Aldrich) e Ácido Lático (HLac) (Riedel-de Haën). Armazenados sob refrigeração (aproximadamente $4 \text{ }^\circ\text{C}$) e ao abrigo de luz. Os solventes metanol, etanol e acetonitrila utilizados, foram todos de grau P.A. ou HPLC, da Merck.

As soluções de hidróxido de sódio (NaOH) (Merck), utilizadas para o condicionamento dos capilares de sílica fundida, foram preparadas nas concentrações de $0,1$ e 1 mol L^{-1} .

As amostras analisadas de fertilizante sólido (Fertilizantes Multifétil, Santa Maria, RS, Brasil), fertilizante foliar líquido (Dimicron Química do Brasil Ltda., Cruz Alta, RS, Brasil), fitoterápico (Pholia magra 500 mg/cápsula, Drogabel[®], Porto Alegre, RS, Brasil), e das plantas medicinais *Persea americana* e *Cyperus rotundus* foram adquiridas no comércio local.

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Eletrólito de trabalho, soluções padrões e preparo de amostras

As soluções do eletrólito de trabalho foram preparadas diariamente através da diluição das soluções estoque. O pH das soluções foi ajustado com uma solução de HNO_3 20% (v/v) e, em seguida, filtradas em membrana de acetato de celulose (poro de $0,45 \mu\text{m}$). Por fim, as soluções foram sonicadas, por 30 minutos, em um sistema de ultra-som antes do seu emprego no sistema CE-C⁴D.

Os padrões dos analitos eram diluídos diariamente, a partir das soluções estoque, conforme a necessidade.

As amostras analisadas (plantas medicinais, fitoterápico e fertilizantes) foram devidamente homogeneizadas antes da determinação de suas massas. As amostras das plantas analisadas estavam sob forma de pó desidratado. Para a determinação na massa da amostra do fitoterápico, preparou-se um *pool* com 10 cápsulas. Determinou-se a massa das amostras em aproximadamente 1 g.

Em seguida, as amostras foram preparadas de duas maneiras, antes de serem analisadas:

- Digestão ácida ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$): seguiu-se o procedimento da Norma EPA 3052 e 3050B. Na prática colocaram-se as massas das amostras em recipientes apropriados para a digestão ácida (frascos Kjeldahl) e adicionou-se 10 mL de ácido nítrico (HNO_3 concentrado). O sistema foi aquecido ($95 \pm 5^\circ\text{C}$) e o aquecimento foi mantido até que todos os vapores nitrosos (marrom) tenham saído. As amostras foram resfriadas e depois se adicionou de 1 a 3 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30%). O sistema novamente foi aquecido ($100 \pm 5^\circ\text{C}$) e o aquecimento foi cessado quando o desprendimento de gás visivelmente acabou. As amostras foram diluídas a um volume final de 50 mL e colocadas em frascos de polipropileno.
- Extração ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$) (1:1): colocou-se as massas das amostras em recipientes apropriados (frascos de polipropileno) e adicionou-se 25 mL da solução de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1); as amostras foram submetidas a um sistema de ultra-som

durante 30 minutos para auxiliar à extração. Após a extração, as amostras foram filtradas em algodão para a remoção do excesso de massa.

Após a digestão ácida e a extração, todas as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (poro de 0,45 μm) e sonicadas durante 30 minutos no sistema de ultra-som. Também, foram realizados testes de diluição das amostras antes de suas injeções no sistema CE-C⁴D, para determinar quais fatores de diluição seriam ideais para a futura análise das amostras.

3.3.2 Condicionamento do capilar de sílica

Para o condicionamento de capilares de sílica fundida novos lavou-se o capilar com NaOH 1 mol L⁻¹ durante 40 minutos, aplicando-se vácuo (-600mm Hg), e em seguida, com água ultra-pura durante 10 minutos.

No condicionamento diário lavou-se o capilar, sob aplicação de vácuo, durante 15 minutos com NaOH 0,1 mol L⁻¹ e em seguida por 10 minutos com água ultra-pura. Finalmente, lavou-se o capilar durante 30 minutos com a solução do eletrólito de trabalho.

Para iniciar as medidas eletroforéticas, posicionou-se nos reservatórios em ambos lados, dos eletrodos, do sistema CE-C⁴D, soluções do eletrólito de trabalho e aplicou-se o potencial de separação (neste caso -10 kV) até a estabilização da linha base (LB) do sinal do detector.

Entre as injeções das amostras lavava-se o capilar com o próprio eletrólito de trabalho durante 5 minutos, sob aplicação de vácuo. E ao final do dia, lavava-se o capilar com água ultra-pura, durante aproximadamente 15 minutos.

3.3.3 Controle de contaminação externa e materiais de uso

Todos os materiais plásticos utilizados como balões volumétricos, recipientes de soluções e amostras, eram submetidos a uma descontaminação prévia com uma solução alcoólica 50% (v/v) com HNO₃ 10% (v/v), por aproximadamente 24 horas, e sem seguida eram abundantemente lavados com água ultra-pura. Este processo era

diário, uma vez que se desejava garantir superfícies livres de qualquer contaminação.

A vidraria também era submetida a uma descontaminação, com uma solução ácida de HNO₃ 1% (v/v) em água. Também por aproximadamente 24 horas e lavada com água ultra-pura em abundância, antes de seu uso.

Uma vez que se trabalhou com metais, deu-se preferência a recipientes e materiais plásticos (HARRIS, 2005).

3.4 Tratamento dos dados experimentais e figuras de mérito

O *software* OriginPro 7.5 foi utilizado para integrar e analisar todos os dados obtidos. Para todas as etapas da otimização das separações eletroforéticas foram realizadas repetições em triplicata ($n = 3$) e utilizados valores de média (das triplicatas) para a elaboração de todos gráficos demonstrados no item 4.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser expresso como:

$$LD = 3 \times S / b$$

onde S é o desvio padrão absoluto, estimado pelo desvio padrão do branco ($n = 7$), e b é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, Revisão 02/2007). O LQ pode ser expresso como:

$$LQ = 10 \times S / b$$

onde S é o desvio padrão absoluto, estimado pelo desvio padrão do branco ($n = 7$), e b é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

A faixa linear de trabalho, ou a linearidade do método, corresponde à capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, Revisão 02/2007) . Fez-se a correlação entre o sinal medido (área) e a concentração dos analitos (mg L^{-1}). A relação matemática entre o sinal e a concentração das espécies de interesse foi expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. As linhas foram definidas por no mínimo 5 pontos que não incluíram o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados.

A estimativa dos coeficientes das curvas analíticas a partir de um conjunto de medições experimentais foi efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes linear e angular, calculou-se o coeficiente de determinação (R^2). Este parâmetro (R^2) permitiu estimar a qualidade das curvas obtidas, onde valores mais próximos de 1, indicam menor dispersão do conjunto de resultados experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A Tabela 7 demonstra as faixas lineares de trabalho para os analitos estudados e suas respectivas equações das retas, com seus coeficientes de determinação (R^2).

A repetitividade do sistema também foi avaliada, envolvendo medições sequenciais ($n = 5$) de uma solução contendo os 14 analitos (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} na concentração de 1 mg L^{-1} e Ti^+ , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} na concentração de 4 mg L^{-1}). Foram calculados o desvio padrão absoluto (S) e o desvio padrão relativo (RSD) (%), também conhecido como coeficiente de variação (CV), para o tempo de migração médio ($n = 5$) dos íons analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das separações eletroforéticas

4.1.1 Otimização da composição do eletrólito de trabalho

A otimização do método para a determinação dos cátions inorgânicos: NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Tl^+ , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} , usando eletroforese capilar de zona (CZE), iniciou pelo estudo da composição do eletrólito de trabalho. Quando se trata de uma determinação de cátions inorgânicos, muitos trabalhos publicados empregam a mistura MES/His, como já citado. Tanto o MES quanto a His apresentam um pH necessário para se obter um sistema tamponado e de baixa condutividade (SILVA *et al.*, 2003).

É importante destacar que a natureza dos contra-íons do eletrólito de trabalho, além de influenciar na seletividade da separação, influenciam na eficiência e na forma dos picos dos cátions analisados (PADARAUSKAS *et al.* 1998). Com o aumento da concentração de MES/His, a condutividade basal do eletrólito de trabalho aumenta proporcionalmente (KUBAN *et al.*, 2002). Uma vez que se está trabalhando com um sistema de detecção por condutividade (C^4D), onde a detecção se dá pela diferença de condutividade do soluto em relação à solução, a concentração do eletrólito de trabalho deve ser cuidadosamente analisada e escolhida.

A mistura MES/His consiste tipicamente em um eletrólito de concentração equimolar da espécie catiônica (His) e da espécie aniônica (MES), numa faixa de concentração de 10 – 60 mmol L^{-1} , fornecendo um pH próximo a 6 (KUBAN *et al.*, 2002). Sendo assim, variou-se a concentração de MES/His de 10 a 50 mmol L^{-1} , onde se visava uma separação com máxima diferença entre as mobilidades dos analitos e a consequente distinção dos seus tempos de migração (T_m) (Figura 25), com um menor número de co-migrações possíveis e maiores alturas dos sinais.

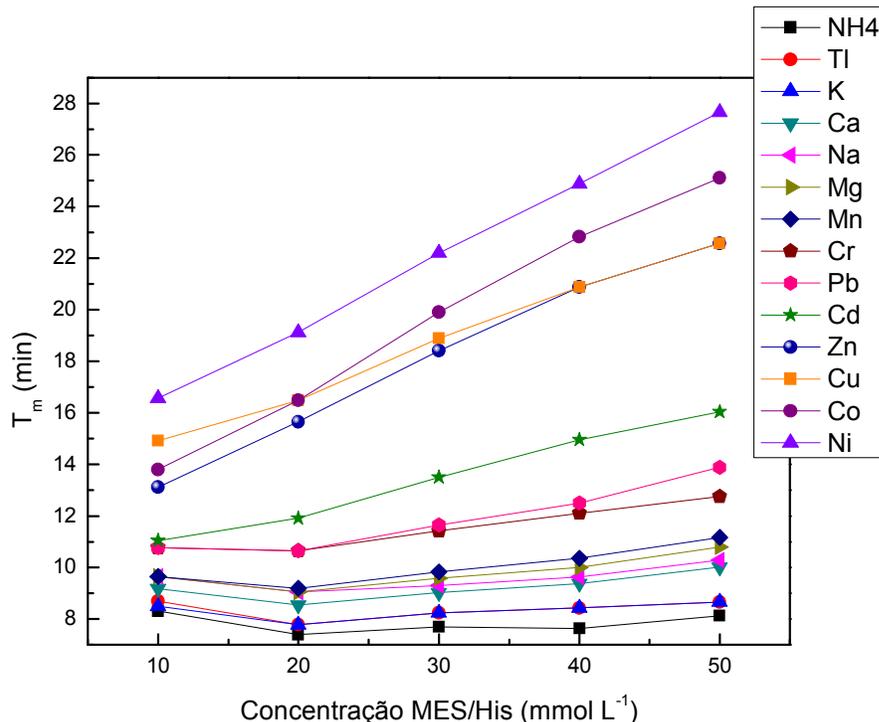


Figura 25: Variação da concentração do eletrólito MES/His ($n = 3$); NH_4 , K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L^{-1} e Tl, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L^{-1} ; Eletrólito de trabalho: MES/His contendo éter 18-coroa-6 2 mmol L^{-1} , pH 6. Potencial de separação: -10 kV . Capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detector C^{4}D operando com 600 kHz e 2 V_{pp} ; temperatura: 25°C ; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s .

Como pode-se observar na análise da Figura 25 que na concentração de 10 mmol L^{-1} de MES/His ocorreram co-migrações como $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ e $\text{Cr}^{3+}/\text{Pb}^{2+}$; já na concentração de 20 mmol L^{-1} , co-migraram também $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$; e nas concentrações de 40 e 50 mmol L^{-1} , diferentemente, passam a co-migrar os íons $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$. Diante disso, optou-se por prosseguir o trabalho com a concentração de MES/His 30 mmol L^{-1} , pois nesta concentração ocorreram menos co-migrações em relação às demais concentrações. A altura dos sinais dos analitos na concentração de 30 mmol L^{-1} foi menos afetada em relação às concentrações maiores (de 40 e 50 mmol L^{-1}). A concentração na mistura MES/His é diretamente proporcional à condutividade do eletrólito de trabalho, sendo assim, nas concentrações de 40 e 50 mmol L^{-1} a condutividade basal do eletrólito de trabalho torna-se maior, diminuindo, portanto, a altura dos sinais dos analitos (KUBAN *et al.*, 2002).

Em seguida, utilizou-se o artifício de adicionar agentes complexantes como aditivos do eletrólito, visando um ganho de resolução, sabendo-se que a separação de cátions é em geral uma prática difícil, em razão das semelhanças de raio iônico efetivo das espécies catiônicas, que se refletem na similaridade da condutância equivalente e da mobilidade aparente (TAVARES, 1997). O uso do éter 18-coroa-6 possibilitou a separação dos íons K^+ e NH_4^+ , que não é possível somente na presença do eletrólito MES/His, o que pode ser observado na Figura 26 (FRANÇOIS, *et al.*, 1995; TIMERBAEV, 1995; CHIARI, 1998; JAGER & TAVARES, 2001; TANYANYIWA & HAUSER, 2002; SILVA *et al.*, 2003).

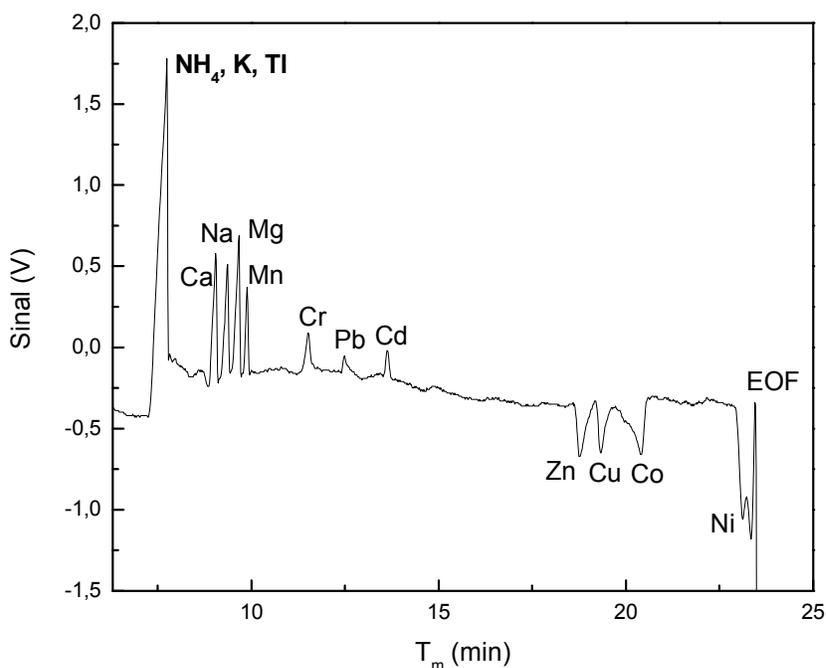


Figura 26: NH_4 , K , Ca , Na , Mg , Mn em 1 mg L^{-1} e Tl , Cr , Pb , Cd , Zn , Cu , Co , Ni em 4 mg L^{-1} ; Eletrólito de trabalho: MES/His 30 mmol L^{-1} sem éter 18-coroa-6, pH 6. Condições experimentais iguais a Figura 25.

A complexação do íon K^+ com o éter 18-coroa-6 é atribuída à semelhança entre o raio iônico hidratado do cátion K^+ (próximo a $2,8 \text{ \AA}$) e à cavidade interna da estrutura do éter 18-coroa-6 (diâmetro da cavidade de $2,6 - 3,2 \text{ \AA}$) (ANTUNES & VOLPE, 1995). Ainda, a constante de formação ($\log K_f$) do complexo de éter 18-

coroa-6 com o íon K^+ ($\log K_f = 2,03$) é maior que a constante de formação, com o íon NH_4^+ ($\log K_f = 1,23$) (YAMABE *et al.*, 1979; TAKAYANAGI, 2005). Sendo assim, a separação entre NH_4^+/K^+ é possível uma vez que a mobilidade aparente do íon K^+ é mais afetada, ou seja, diminuída, tornando o T_m do íon K^+ maior em relação ao íon NH_4^+ .

Como se trata de um mecanismo especial de complexação (formação de complexos de inclusão), o éter 18-coroa-6 foi especialmente utilizado para separar K^+/NH_4^+ . No entanto, observou-se que a mobilidade aparente dos outros cátions estudados não foi significativamente afetada, uma vez que seus raios iônicos hidratados não apresentam semelhança de tamanho em relação a cavidade interna da estrutura do éter 18-coroa-6 (Tabela 2). Portanto, não havendo melhora na resolução entre eles. A Tabela 2 mostra o raio iônico hidratado de cada íon catiônico estudado.

Tabela 2 – Raio iônico hidratado (Å) dos íons catiônicos estudados. Fontes: DAL BOSCO *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; SHINZATO, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010.

| Íon | Raio iônico hidratado (Å) | Íon | Raio iônico hidratado (Å) |
|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|
| NH_4^+ | ~3,0 | Cr^{3+} | 4,61 |
| K^+ | ~2,8 | Pb^{2+} | 4,01 |
| Na^+ | 3,58 | Cd^{2+} | 4,26 |
| Ca^{2+} | 4,12 | Zn^{2+} | 4,3 |
| Mn^{2+} | 4,38 | Co^{2+} | 4,23 |
| Mg^{2+} | 4,28 | Cu^{2+} | 4,19 |
| Tl^+ | ~3,0 | Ni^{2+} | 4,04 |

As concentrações testadas de éter 18-coroa-6 foram de 0,5 a 10 mmol L^{-1} , optando-se pela concentração de 1,5 mmol L^{-1} , onde se obteve uma separação satisfatória para os íons esperados (K^+ e NH_4^+) e para os demais analitos estudados (Figura 27). A altura dos sinais de alguns analitos diminuiu à medida que a concentração de éter 18-coroa-6 foi aumentando no eletrólito de trabalho, isso ocorre, pois a condutividade basal deste também é alterada, diminuindo assim a sensibilidade do método.

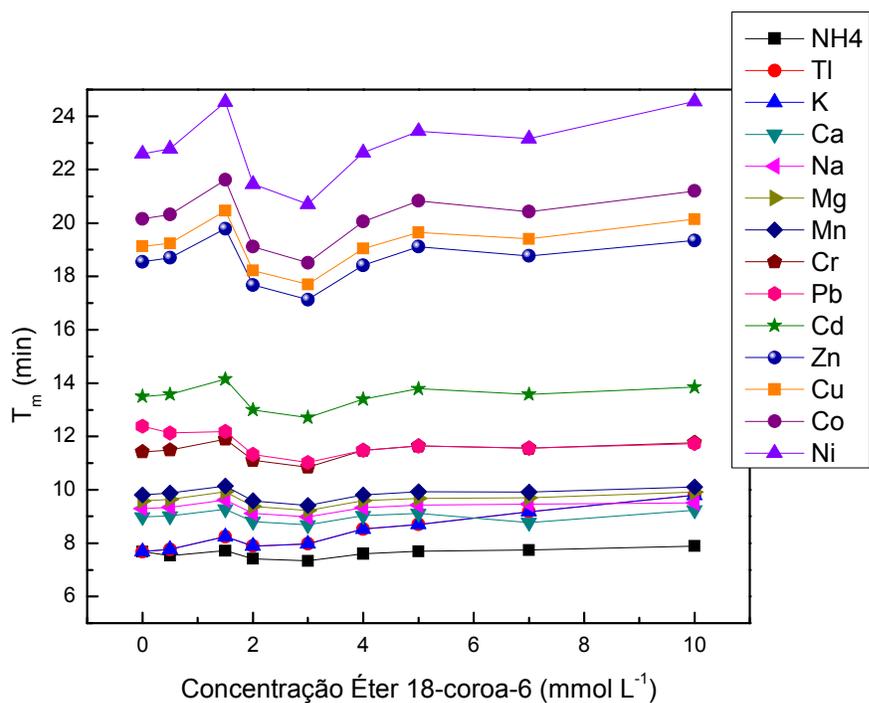


Figura 27: Variação da concentração do éter 18-coroa-6 ($n = 3$) no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} , pH 6).

Na Figura 28, pode-se ver o eletroferograma obtido para a separação eletroforética de todos os analitos estudados, com destaque para a separação dos íons K^+/NH_4^+ na presença de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de éter 18-coroa-6.

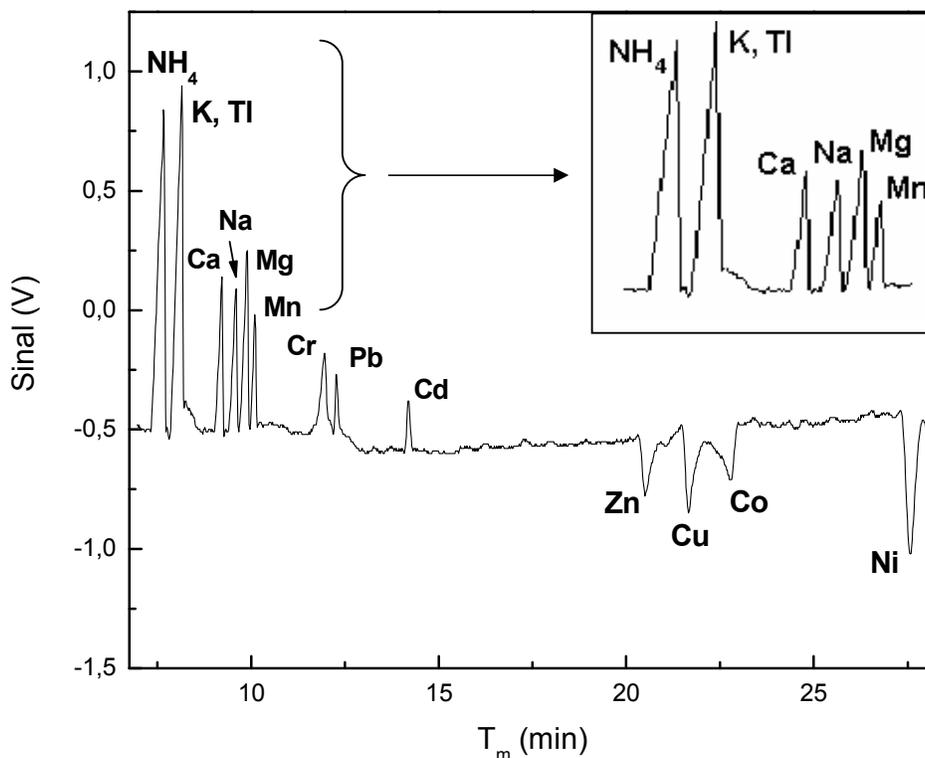


Figura 28: Eletroferograma representativo da separação dos analitos: NH₄, K, Ca, Na, Mg, Mn em 1 mg L⁻¹ e TI, Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L⁻¹; Eletrólito de trabalho: MES/His 30 mmol L⁻¹ contendo éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹, pH 6.

Pode-se observar na Figura 28 que um problema de co-migração dos íons TI⁺ e K⁺ permanece. O uso de solventes como MeOH, EtOH e ACN também foi testado, na presença de MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹ na tentativa de melhorar a seletividade da separação dos íons TI⁺/K⁺, uma vez que solventes orgânicos são caracterizados como agentes modificadores do fluxo eletrosmótico por afetarem principalmente a viscosidade do eletrólito de trabalho (TIMERBAEV *et al.*, 1996; QU *et al.*, 2004). Concentrações de 2 a 30% (v/v) para acetonitrila (ACN), de 2 a 15% (v/v) para metanol (MeOH) e de 2 a 15% (v/v) para etanol (EtOH) foram testadas. As faixas de concentração testadas dos solventes foram baseadas em pesquisas na literatura disponível (TIMERBAEV *et al.*, 1996; SARMINI & KENNDLER, 1997; TIMERBAEV, 1997; CARVALHO *et al.*, 2009).

Além do esperado aumento do tempo de migração (T_m) dos analitos, com o aumento da concentração do solvente no eletrólito de trabalho, observou-se algumas co-migrações e o aumento da instabilidade da condutividade basal do eletrólito. A Figura 29 mostra que a proporção de 5% (v/v) de cada solvente, usado alternadamente na composição do eletrólito de trabalho, é suficiente para aumentar o T_m dos analitos.

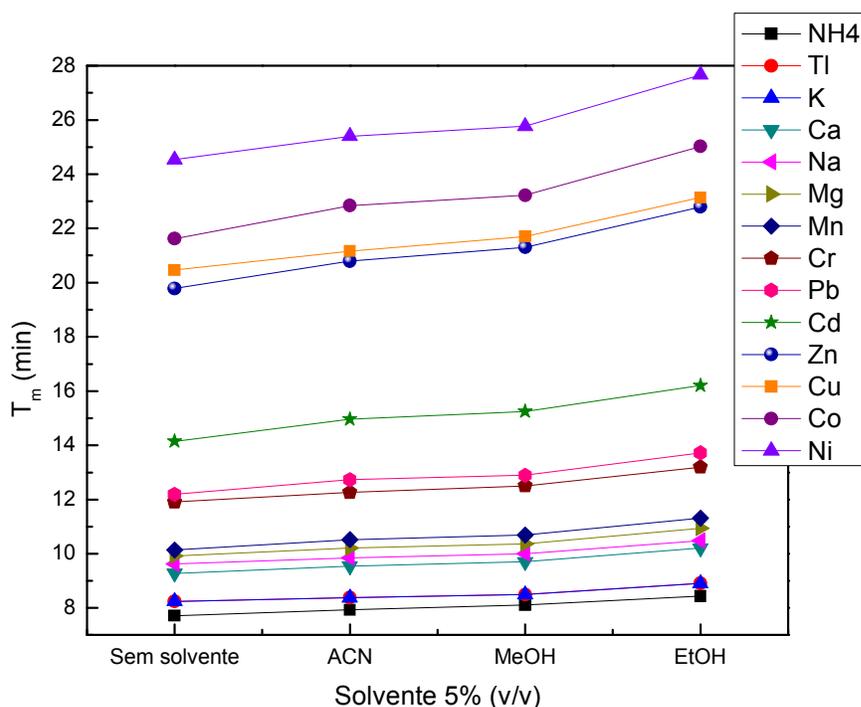


Figura 29: Aumento do tempo de migração dos analitos na presença dos solventes ACN, EtOH e MeOH 5% (v/v) na composição do eletrólito de trabalho ($n = 3$).

O aumento mais intenso dos T_m dos analitos na presença do EtOH se deve pois este é o solvente que apresenta maior viscosidade em relação aos demais (EtOH $\eta = 1,078$; MeOH $\eta = 0,545$; ACN $\eta = 0,341$ (mPa s), a 25°C) e menor constante dielétrica (EtOH $\epsilon = 24,55$; MeOH $\epsilon = 32,70$; ACN $\epsilon = 37,5$) (RIEKKOLA *et al.*, 2000).

A Figura 30 também mostra que essa proporção de 5% (v/v) de cada solvente na composição do eletrólito de trabalho é suficiente para diminuir a altura dos sinais

dos analitos. Assim como os T_m , as alturas dos sinais também foram mais afetadas na presença do EtOH, para a maioria dos analitos. Melhoras nas resoluções entre os sinais não foram observadas. Não sendo viável, então, para este método a utilização de tais solventes.

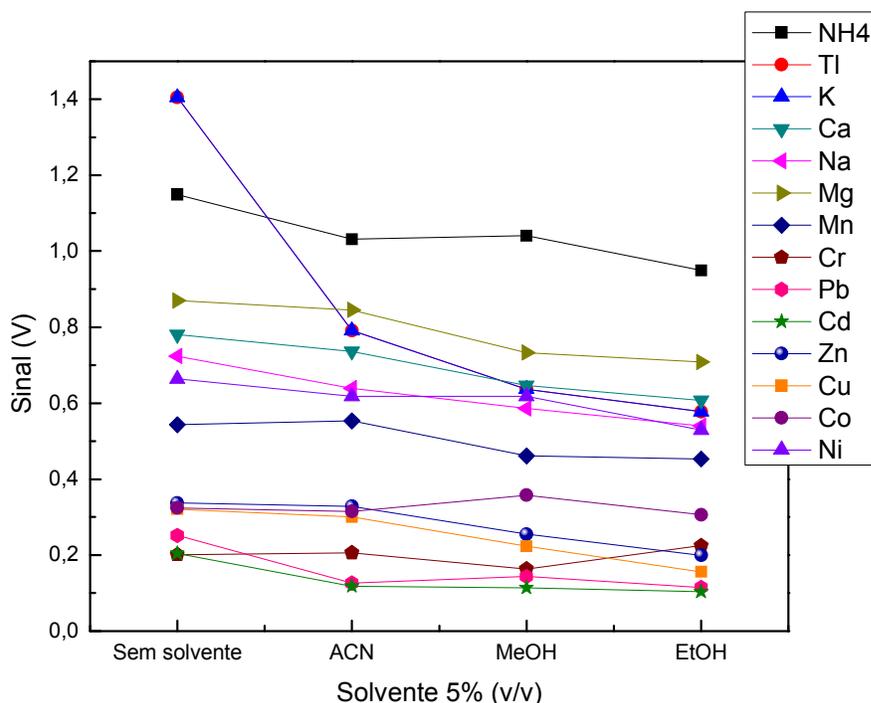


Figura 30: Diminuição dos sinais dos analitos na presença dos solventes ACN, EtOH e MeOH na composição do eletrólito de trabalho ($n = 3$).

Variando a composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6) com o uso de outros agentes complexantes como o ácido 2-hidróxiisobutírico (HIBA) (de 1 a 5 mmol L^{-1}), bastante empregado para a separação de metais (CONRADI *et al.*, 1996), observou-se que com o aumento da concentração deste, além da condutividade basal aumentar, aumentou também a instabilidade da linha base. Alguns analitos passaram a co-migrar, como $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ na concentração de 5 mmol L^{-1} de HIBA na composição do eletrólito, o que acusa que suas mobilidades aparentes tornaram-se muito próximas (Figura 31 A).

Ainda, testou-se a adição de ácido láctico (HLac) (de 1 a 10 mmol L^{-1}) na composição do eletrólito. Assim como o HIBA, o HLac costuma ser amplamente

empregado para se obter a separação de cátions metálicos com mobilidades aparentes próximas (FRANÇOIS *et al.*, 1995). Observou-se, também, que o aumento da instabilidade basal é bastante pronunciado à medida que se aumenta a concentração de HLac no meio. Na concentração de 10 mmol L^{-1} de HLac no eletrólito, além dos íons $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, passaram a co-migrar os íons $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$, o que é indesejável (Figura 31 B).

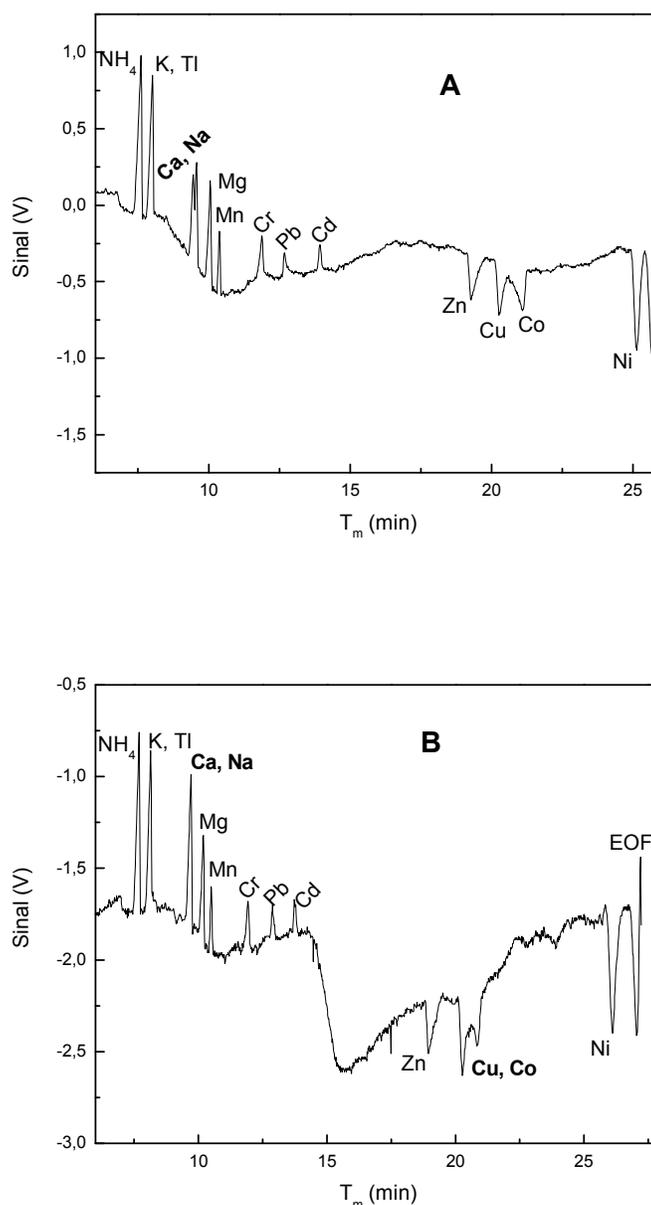


Figura 31: Adição de (A) HIBA 5 mmol L^{-1} e de (B) HLac 10 mmol L^{-1} na composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6).

O aumento da condutividade basal para o uso dos dois complexantes (HIBA e HLac) levou à diminuição da altura dos sinais para a maioria dos analitos, uma vez que as diferenças de condutividade entre a solução (eletrólito) e os solutos (analitos) tornaram-se menores. Na Figura 32, pode-se notar que sem a adição destes aditivos o sinal é maior para a maioria dos analitos. A Figura 32 também confirma as co-migrações dos íons $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e $\text{Cu}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ na presença de HIBA 5 mmol L^{-1} e de HLac 10 mmol L^{-1} na composição do eletrólito.

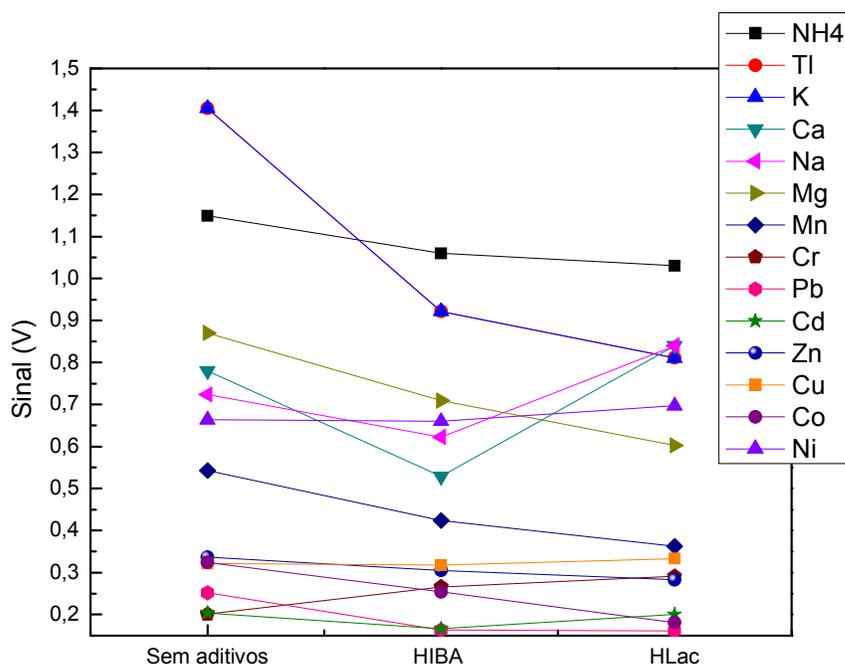


Figura 32: Diminuição dos sinais dos analitos na presença de HIBA 5 mmol L^{-1} e de HLac 10 mmol L^{-1} ($n = 3$) na composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L^{-1} , pH 6).

Uma vez que o uso destes dois complexantes (HIBA e HLac), usados alternadamente na composição do eletrólito de trabalho, não foi suficientemente eficaz para solucionar o problema de co-migração persistente (K^+/TI^+), também não foram viáveis para o desenvolvimento desta metodologia.

Diferentemente, a presença de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) na composição do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L^{-1} , pH 6)

permitiu a separação seletiva dos íons K^+ e Tl^+ e estes passaram a não mais co-migrar (Figura 33).

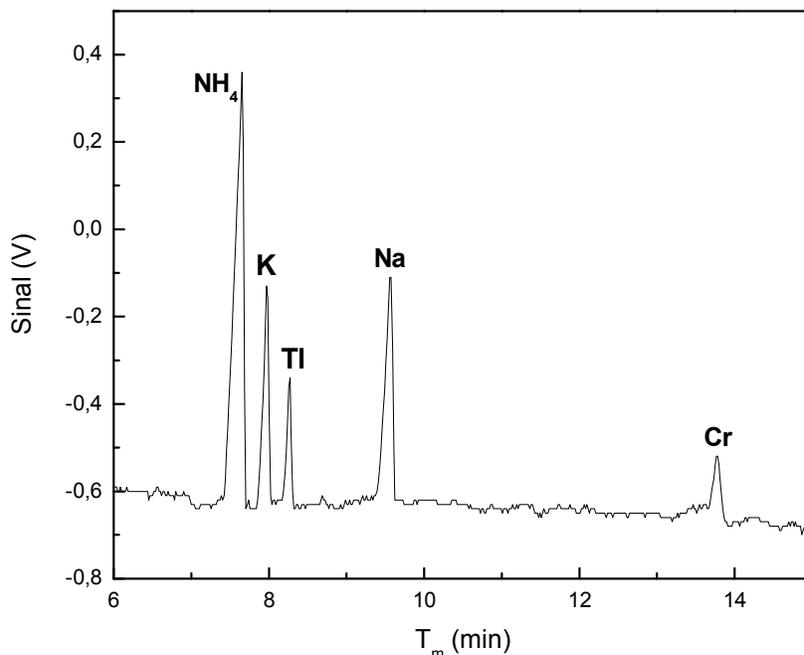


Figura 33: Eletroferograma representativo da separação dos analitos: NH_4 , K , Ca , Na , Mg , Mn em 1 mg L^{-1} e Tl , Cr , Pb , Cd , Zn , Cu , Co e Ni em 4 mg L^{-1} ; Eletrólito de trabalho: $MES/His\ 30\text{ mmol L}^{-1}$ contendo éter 18-coroa-6 $1,5\text{ mmol L}^{-1}$ e ácido cítrico 1 mmol L^{-1} , pH 6.

Nota-se que permanece no cenário de separação apenas os íons NH_4^+ , K^+ , Tl^+ , Na^+ e Cr^{3+} , ilustrado na Figura 33. Deve-se destacar que se está trabalhando com o eletrólito em pH 6. Portanto, nessa condição o ácido cítrico, como apresenta três pKs ($pK_1\ 3,13$; $pK_2\ 4,76$; $pK_3\ 7,40$) está na forma de ânion bivalente ($C_6H_6O_7^{2-}$) (NESTERENKO *et al.*, 2008). Logo, o Cr^{3+} permanece como cátion mesmo na forma complexada ($[Cr(C_6H_6O_7)]^+$), uma vez que está na forma de cátion trivalente.

Já os íons que complexaram com o ácido cítrico, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} , ficaram, provavelmente, na forma de moléculas neutras com o citrato ($C_6H_6O_7^{2-}$), portanto desaparecendo do eletroferograma. Isso ocorre também devido à constante de formação ($\log K_f$) de complexos com ácido cítrico para esses íons ser mais favorável (Tabela 3) (NESTERENKO *et al.*, 2008). O mesmo comportamento, do desaparecimento de cátions do cenário de separação,

também foi observado no trabalho de Kuban e colaboradores (2002), para concentrações de ácido cítrico maiores que $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ na composição do eletrólito de trabalho.

Tabela 3 – Constantes de formação ($\log K_f$) dos complexos metálicos dos cátions estudados com ácido cítrico. Fonte: ^aNESTERENKO *et al.*, 2008; ^bMcGRAW-HILL (*Handbook*), 2004.

| | $\log K_f$ | | $\log K_f$ |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Na ⁺ | 0,75 ^a | Co ²⁺ | 4,90 ^a |
| K ⁺ | 0,60 ^a | Zn ²⁺ | 4,93 ^a |
| Mg ²⁺ | 3,43 ^a | Cd ²⁺ | 3,76 ^a |
| Ca ²⁺ | 3,48 ^a | Cu ²⁺ | 3,70 ^a |
| Mn ²⁺ | 3,76 ^a | Ni ²⁺ | 5,18 ^a |
| Pb ²⁺ | 6,50 ^b | | |

As possíveis explicações para a separação entre K⁺ e TI⁺, na presença do ácido cítrico, é que este pode afetar o equilíbrio de complexação do TI⁺ em relação ao eletrólito MES/His, uma vez que reações de complexação frequentemente acontecem entre íons de metais de transição e os eletrólitos orgânicos (como o sistema MES/His), auxiliando na separação devido a mudanças nas mobilidades aparentes dos íons (WANG *et al.*, 2007). Deste modo, o ácido cítrico pode tornar o TI⁺ mais lento, aumentando assim seu tempo de migração (T_m), sendo suficiente para separá-lo do íon K⁺.

Além deste efeito, a presença do ácido cítrico pode modificar a esfera de hidratação do TI⁺ complexado com o éter 18-coroa-6, o que também pode levar à mudança de sua mobilidade aparente. Sabe-se que o raio iônico hidratado de um íon em solução aquosa é o raio efetivo do íon mais a espessura correspondente à camada de moléculas de água que estão fortemente ligadas a ele. E que a velocidade com que o íon migra em um campo elétrico também depende do raio iônico hidratado e não do tamanho do íon desprotegido (HARRIS, 2005). Sendo assim, se na presença de ácido cítrico alterar a esfera de solvatação do complexo TI⁺/éter 18-coroa-6, será alterada também a razão carga/raio iônico (q_i/r_i), relacionada à expressão da mobilidade eletroforética ($\mu_{ef} = q_i / 6\pi\eta.r_i$), e portanto,

ligada diretamente com a mobilidade aparente do íon ($\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{eo}$). Deste modo, se a mobilidade aparente do complexo (Tl^+ /éter 18-coroa-6) diminuir, seu tempo de migração (T_m) irá aumentar, sendo suficiente para separá-lo do íon K^+ .

Observou-se que com o aumento da concentração do ácido cítrico (de 0,5 a 5 $mmol L^{-1}$), o T_m do Tl^+ aumentou com mais intensidade em relação aos T_m dos íons NH_4^+ , K^+ e Na^+ (Figura 34).

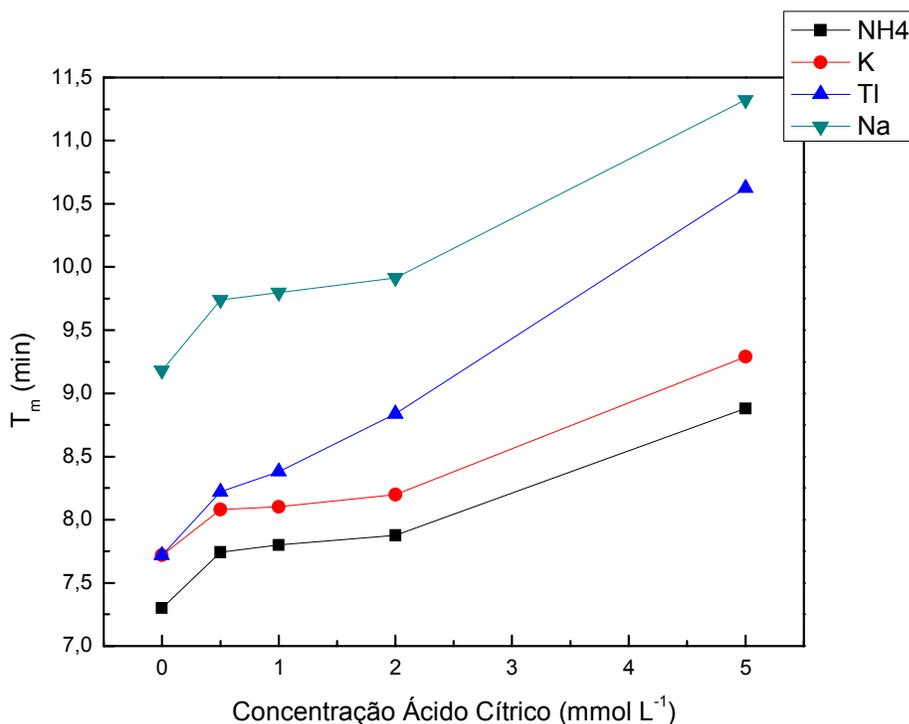


Figura 34: Variação dos tempos de migração dos íons Tl^+ , K^+ , NH_4^+ e Na^+ em função da concentração do ácido cítrico ($n = 3$) no eletrólito de trabalho (MES/His $30 mmol L^{-1}$ e éter 18-coroa-6 $1,5 mmol L^{-1}$, pH 6).

Uma possível justificativa, como já citado, é que uma vez que o ácido cítrico altera a esfera iônica de hidratação do complexo em questão, também modifica sua solvatação no meio. O complexo de Tl^+ com o éter 18-coroa-6, diferentemente dos metais alcalinos e alcalinos terrosos, é mais fortemente afetado na presença de diferentes solventes, como já descrito por Yamabe e colaboradores (1979), o que também pode ser comprovado na Figura 34.

Com o aumento da concentração de ácido cítrico na composição do eletrólito de trabalho, assim como para os demais aditivos testados, observou-se o aumento da condutividade basal do eletrólito e a instabilidade da linha base. Embora a concentração testada de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ tenha fornecido maiores áreas para os picos, não foi suficientemente adequada para separar K^+/TI^+ . A concentração de ácido cítrico escolhida para prosseguir o trabalho foi a de 1 mmol L^{-1} , onde a separação dos íons K^+ e TI^+ foi satisfatória e a área dos picos dos analitos foi menos alterada em relação a concentrações maiores de 2 e 5 mmol L^{-1} (Figura 35).

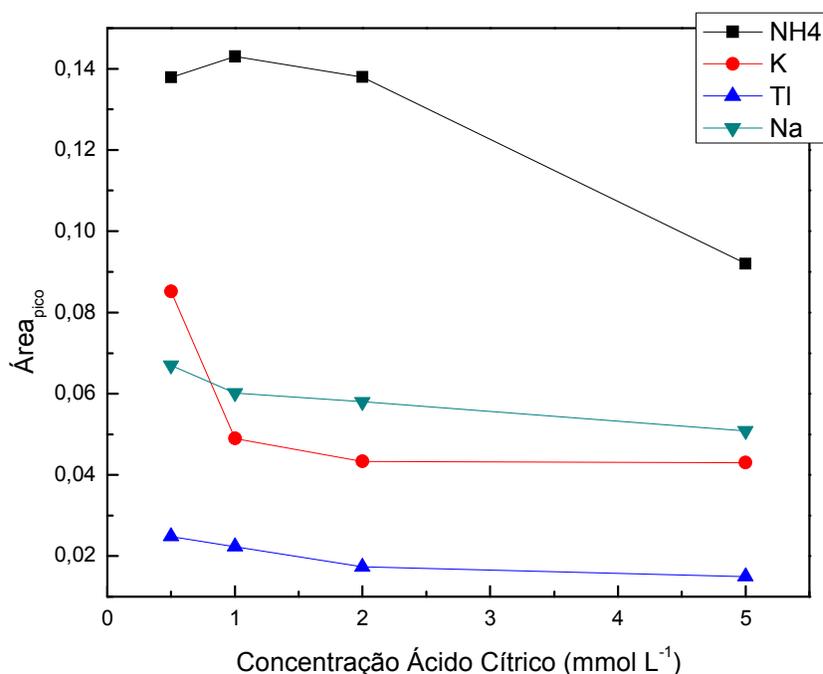


Figura 35: Variação das áreas dos íons TI^+ , K^+ , NH_4^+ e Na^+ em função da concentração de ácido cítrico ($n = 3$) no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6).

Portanto, a separação dos cátions deve ser executada em 2 etapas, caso a determinação de TI^+ seja necessária na amostra:

- **Etapa (1)** – Eletrólito: MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 6; separação de NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} ;

- **Etapa (2)** – Eletrólito: MES/His 30 mmol L⁻¹, éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹ e ácido cítrico 1 mmol L⁻¹, em pH 6; separação de K⁺ e Tl⁺.

A escolha do pH do eletrólito de trabalho é um passo crucial na otimização da separação eletroforética. Separações diferentes necessitam de um fluxo eletrosmótico maior ou menor. A mobilidade eletrosmótica é diretamente proporcional à densidade de carga superficial na sílica, presente no interior do capilar. Em pH 2, há pouca carga nos grupos silanol e pouco fluxo eletrosmótico. Em pH 11, a parede do capilar está muito carregada e fluxo eletrosmótico é intenso.

Assim, a eletrosmose diminui em pH mais baixo (pH < 4), uma vez a densidade da carga superficial da sílica tende a diminuir ($-\text{Si-O}^- \rightarrow -\text{Si-OH}$), afetando diretamente o fluxo eletrosmótico (HARRIS, 2005). Em pH mais alto (pH > 8), pode ocorrer a dissociação dos grupos silanóis, aumentando a velocidade o fluxo eletrosmótico, levando a uma consequente diminuição nos tempos de migração de alguns analitos, o que pode ser indesejável (CHIARI, 1998). Já para os metais de transição, costuma ocorrer o inverso. Em pH elevado, a mobilidade aparente destes metais diminui, gerando picos alargados e longos tempos de migração (KUBAN *et al.*, 2002).

Com o aumento do pH do eletrólito, a dissociação dos agentes complexantes também costuma aumentar, alterando assim no equilíbrio de complexação entre estes complexantes com os íons envolvidos. Deste modo, podem ocorrer variações nas mobilidades aparentes dos analitos, podendo ser favorável, se um pH ótimo for escolhido em função do aumento da seletividade da separação eletroforética. Assim, na determinação de cátions metálicos costuma-se trabalhar numa faixa de pH de 3,5 a 6 (FRANÇOIS *et al.*, 1995; TIMERBAEV, 1997; KUBAN *et al.*, 2002).

Variou-se, então, o pH do eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹) na faixa de 4,3 a 6. Na Figura 36, pode-se observar que a medida que o pH aumenta, os tempos de migração para os íons Zn²⁺ e Co²⁺ também aumenta, diferentemente, para os demais íons os T_m diminuíram.

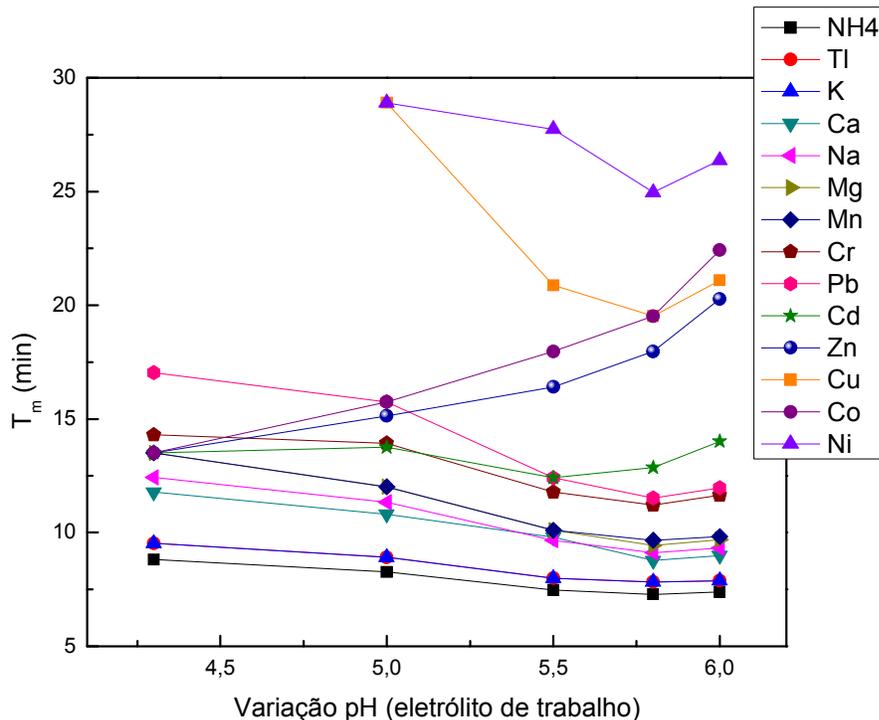


Figura 36: Variação dos T_m dos analitos em função do pH ($n = 3$) do eletrólito de trabalho, a 25°C (MES/His 30 mmol L^{-1} e éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

Nota-se, ainda na Figura 36, que em pH 4,3 houve a co-migração de alguns íons como o Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} . Além disso, os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} não foram detectados, possivelmente, por apresentarem mobilidades aparentes muito baixas em pH 4,3. Em pH 5, os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} foram detectados, mas co-migraram; em pH 5,5, permaneceu a co-migração dos íons Cr^{3+} e Pb^{2+} e os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} foram separados; em pH 5,8, o Cu^{2+} volta a co-migrar, agora com o Co^{2+} .

Nesse contexto, o pH 6,0 foi escolhido pois além de não apresentar co-migrações de analitos, exceto para o K^+/TI^+ (problema resolvido na presença de ácido cítrico 1 mmol L^{-1}), não gerou instabilidade na linha basal do eletrólito, e permitindo uma boa sensibilidade aos sinais dos analitos (Figura 37). Nos pHs inferiores a 6, a instabilidade da linha basal foi mais pronunciada, e em casos como no pH 4,3 e no pH 5, chegando a deformar o eletroferograma.

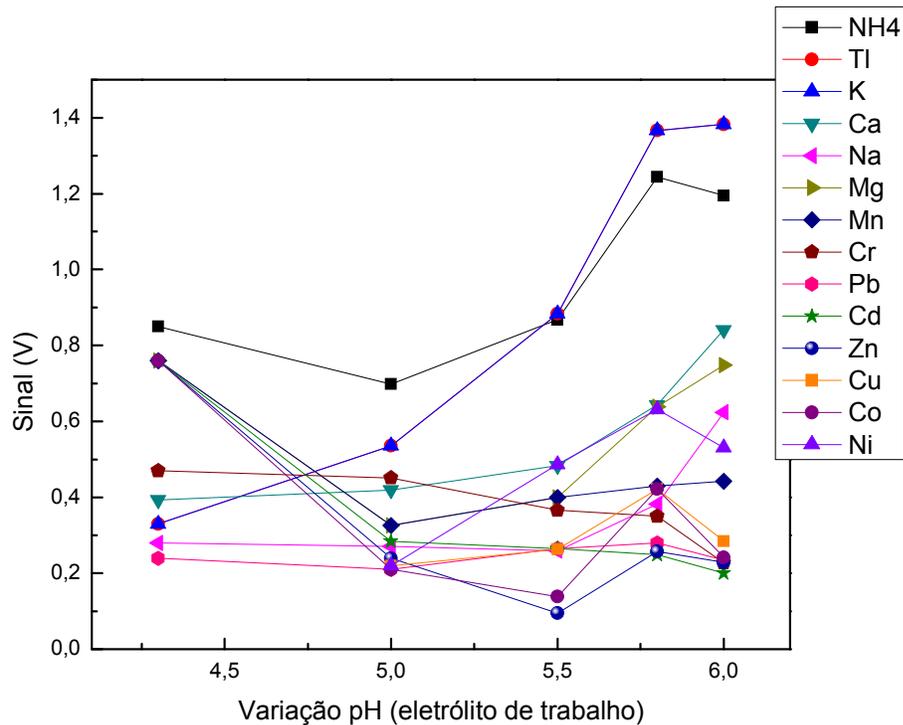


Figura 37: Variação da intensidade dos sinais dos analitos em função do pH ($n = 3$) do eletrólito de trabalho, a 25°C (MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹).

4.1.2 Otimização dos parâmetros operacionais

Partindo-se da composição do eletrólito já determinada, definiu-se então o potencial aplicado para as separações eletroforéticas (de -8 a -20 kV), seguido da variação do capilar (diâmetro interno *versus* comprimento total: 50 μm x 68 cm; 75 μm x 68 cm; 75 μm x 75 cm; 75 μm x 80 cm).

Sabendo-se que mobilidade eletroforética ($\mu_{\text{ef}} = \mu_i = v_i/E$) dos íons é afetada pela mudança do campo elétrico aplicado assim como a mobilidade eletrosmótica ($\mu_{\text{eo}} = v_{\text{eo}}/E$), a mobilidade aparente dos íons ($\mu_{\text{ap}} = \mu_{\text{ef}} + \mu_{\text{eo}}$) pode ser manipulada, otimizando-se o potencial de separação aplicado, visando um ganho de resolução na separação dos íons inorgânicos estudados.

Variou-se o potencial aplicado de -8 kV a -20 kV. Como é de se esperar, o aumento do potencial leva a uma redução dos tempos de migração dos íons, pois aumenta suas velocidades de migração (Figura 38).

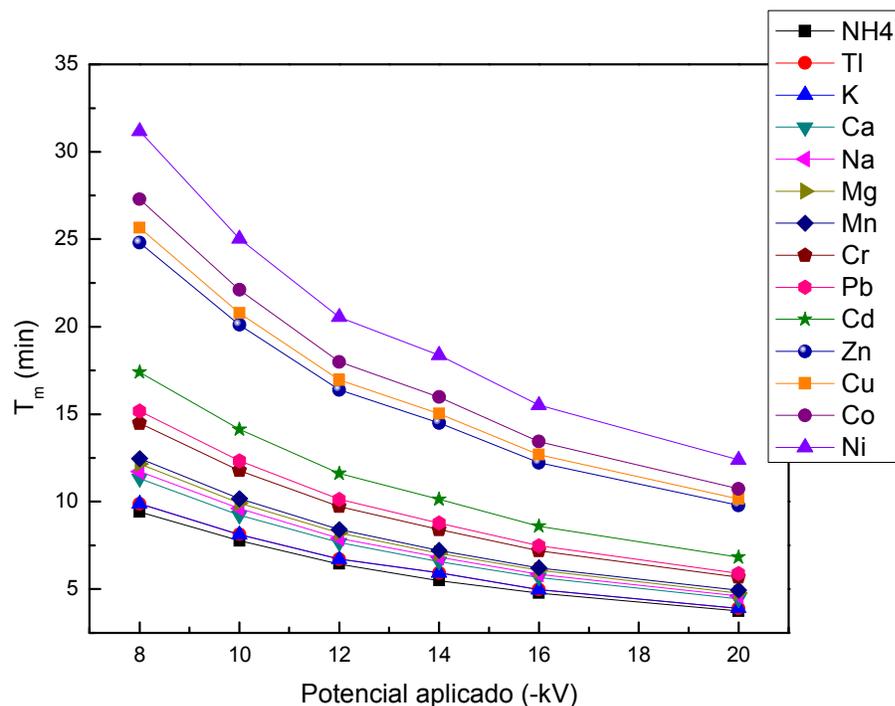


Figura 38: Variação dos T_m dos analitos em função da variação do potencial de separação aplicado ($n = 3$).

Alterações significativas nas intensidades dos sinais dos analitos não foram observadas. Embora se pode separar todos os analitos aplicando-se -20 kV, sem ocorrer co-migrações, optou-se por permanecer utilizando do potencial de separação de -10 kV.

Avaliou-se também o capilar em função do seu diâmetro interno (D.I.) (μm) e do seu comprimento total (cm). Diâmetros internos menores, como 50 μm , costumam fornecer melhor resolução ao sistema, pois a dissipação do calor, teoricamente, é mais rápida e eficaz. Testou-se o capilar de 50 μm (D.I.) por 68 cm de comprimento total. Comparado com o capilar utilizado neste trabalho até então de 75 μm (D.I.) por 68 cm de comprimento total, o capilar de 50 μm (D.I.) não forneceu

melhor resolução, contrariamente, gerou sinais menores para os analitos em relação ao capilar de 75 μm (D.I.) (Figura 38) e T_m maiores. Testou-se, também, capilares de 75 μm (D.I.) por 75 cm e de 75 μm (D.I.) por 80 cm de comprimento total. Estes também forneceram sinais menores para a maioria dos analitos em relação ao capilar de 68 cm (Figura 39) e T_m também maiores.

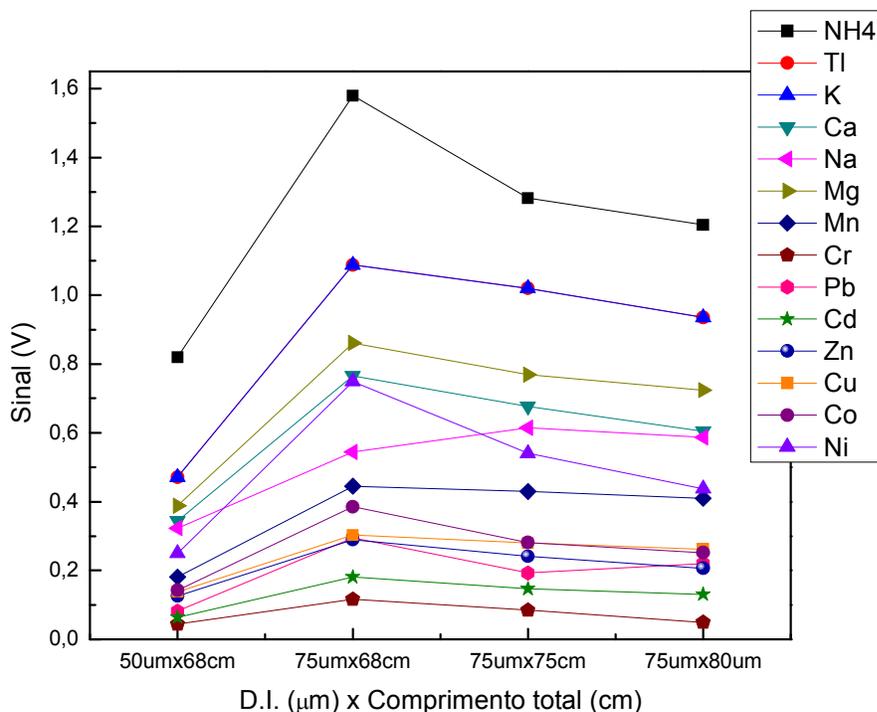


Figura 39: Variação da intensidade dos sinais dos analitos em função da variação do capilar ($n = 3$).

A Tabela 4 mostra resumidamente as condições experimentais otimizadas para a determinação dos cátions inorgânicos por CZE- C^4D .

Tabela 4 – Condições experimentais otimizadas para determinação dos 14 analitos inorgânicos.

| Parâmetros | Condições Otimizadas |
|---------------------------------------|--|
| Eletrólito de trabalho | MES/His 30 mmol L ⁻¹ Éter 18-coroa-6 1,5 mmol L ⁻¹ (Ácido Cítrico 1 mmol L ⁻¹) |
| pH do eletrólito | 6 |
| Potencial de separação | -10 kV |
| Capilar de sílica fundida | 75 µm x 68 cm |
| Injeção da amostra (anódica) | Hidrodinâmica (gravidade) |
| Altura <i>versus</i> Tempo de Injeção | 20 cm x 60 s |
| Amplitude do sinal na detecção | 2 V _{pp} |
| Frequência de operação do detector | 600 kHz |
| Temperatura de trabalho | 25 ± 1°C |

A polaridade da fonte de alta tensão utilizada foi a ideal para detecção de cátions, portanto, com injeção anódica (pólo positivo) e detecção catódica (pólo negativo). O detector C⁴D sempre operando com frequência de 600 kHz e variando a amplitude em 2 V_{pp} (pico a pico). A temperatura utilizada foi de 25 ± 1°C durante todo o trabalho. A introdução da amostra foi feita por diferença de pressão, ou seja, injeção hidrodinâmica por gravidade, onde se eleva a extremidade anódica a 20 cm por 60 s, possibilitando a entrada de um volume de amostra (na ordem de nanolitros) para o interior do capilar.

4.1.3 Otimização das estratégias de pré-concentração da amostra

Neste trabalho, dois modos de pré-concentração *on-line* (*sample stacking*) dos analitos foram testados: *stacking* mediado por força iônica e o *stacking* em campo amplificado.

No *stacking* mediado por força iônica, um grande volume de amostra, preparada em solvente menos condutor (água) que o eletrólito foi introduzido hidrostáticamente no capilar (JUN *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2009). Após a injeção da amostra (hidrodinâmica 20 cm x 60 s), testes variando a aplicação do potencial de -2 a -20 kV, por intervalos de tempo de 15 a 60 s foram realizados. Primeiramente, os testes foram realizados na presença de dois analitos apenas, Na⁺ e Cd²⁺. Os melhores resultados encontrados para os dois analitos foram aplicados então para todos os íons estudados. Os maiores ganhos de sensibilidade foram na aplicação de -20 kV pelo período de 15 s, como se pode ver na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação dos modos de *sample stacking* empregados. Aumento de área, em porcentagem (%), para cada analito em função da condição empregada na pré-concentração (potencial aplicado (-kV) versus tempo (segundos)).

| Sample Stacking - Força Iônica | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Condição | NH ₄ | K | TI* | Ca | Na | Mg | Mn | Cr | Pb | Cd | Zn | Cu | Co | Ni |
| 5 kV x 30s | 86,4 | 8,3 | 13,6 | 10,8 | 12,6 | 9,3 | 23,6 | 17,1 | 8,7 | 10,5 | 13,8 | -1,8 | 9,4 | 8,2 |
| 10 kV x 60s | 112,1 | 13,1 | 4,5 | 9,5 | 22,7 | 9,3 | 24,2 | 34,3 | 0,0 | 15,8 | 13,8 | 3,5 | 12,5 | 3,5 |
| 20 kV x 15s | 78,8 | 22,6 | 0,0 | 12,2 | 21,2 | 11,6 | 30,3 | 28,6 | 17,4 | 10,5 | 25,9 | 17,5 | 15,6 | 35,3 |
| Sample Stacking - Campo Amplificado (Plug de Água = 200mm x 30s) | | | | | | | | | | | | | | |
| Condição | NH ₄ | K | TI* | Ca | Na | Mg | Mn | Cr | Pb | Cd | Zn | Cu | Co | Ni |
| 5 kV x 30s | 19,7 | -20,2 | 9,1 | -28,4 | -27,3 | -29,1 | -10,9 | -5,7 | -47,8 | -31,6 | -25,9 | -36,8 | -40,6 | N. D.** |
| 20 kV x 15s | 101,5 | 28,6 | -65,5 | 17,6 | -7,6 | -11,6 | 30,3 | 11,4 | 8,7 | 15,8 | 6,9 | 1,8 | -12,5 | N. D.** |

* Tálcio determinado na presença de ácido cítrico 1 mmol L⁻¹ no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1 mmol L⁻¹, pH 6).

** Analito não detectado.

Já no *stacking* em campo amplificado, a amostra também foi preparada em um solvente menos condutor (água) que o eletrólito e foi injetada eletrocineticamente no capilar, aplicando-se um potencial negativo, na extremidade da detecção no caso de cátions. Antes da introdução da amostra, uma banda (*plug*) de água foi introduzida hidrodinamicamente (20 cm x 30s) no capilar para garantir as condições de *stacking* em campo elétrico elevado (QUIRINO & TERABE, 2000; MORAES *et al.*, 2009). Testes variando a injeção eletrocinética da amostra, com aplicação do potencial de -2 a -20 kV, por intervalos de tempo de 15 a 60 s foram realizados. Da mesma forma, primeiramente, os testes foram realizados na presença de dois analitos apenas, Na⁺ e Cd²⁺. Os melhores resultados encontrados para estes foram aplicados então para todos os íons estudados. Os ganhos de sensibilidade, ou seja, no aumento da área dos picos dos analitos, neste caso, foram inferiores para a maioria dos íons em relação ao modo de força iônica (Tabela 5).

Observando-se os resultados demonstrados na Tabela 5 (salientados em negrito), nota-se que a melhor condição de pré-concentração para a maioria dos cátions foi obtida com o *stacking* mediado por força iônica, aplicando-se -20 kV por 15 segundos, onde pode obter-se aumentos de área mais significativos para a maioria dos analitos estudados.

Embora os ganhos de sensibilidade utilizando técnicas de pré-concentração, para este trabalho, não tenham sido da grandeza esperada, estas técnicas são de grande valia para a eletroforese capilar. É possível aumentar a sensibilidade de um método na ordem de 10 – 100 utilizando a estratégia de *stacking* mediado por força iônica, e na ordem de 100 – 1000 utilizando a estratégia de *stacking* em campo amplificado. Além disso, são técnicas simples, feitas *on-line*, ou seja, no momento da injeção da amostra no capilar, e podem ser aplicadas tanto na determinação de cátions, quanto na determinação de ânions, em geral. Obviamente a escolha da estratégia vai depender do tipo de analito e do aumento de sensibilidade necessário para a execução da análise (JUN *et al.*, 2007; SIMPSON Jr. *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010).

4.2 Avaliação do método analítico

Concluída a etapa de otimização das condições experimentais para a separação eletroforética dos 14 cátions inorgânicos, passou-se para a avaliação do método que tem por objetivo mostrar a qualidade das medições químicas, verificar e garantir as características de desempenho do método desenvolvido e demonstrar que o método é cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado.

Neste trabalho os parâmetros avaliados, ou as figuras de mérito, do método eletroforético proposto, para a determinação dos analitos em questão foram: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa linear de trabalho e repetitividade, seguindo como parâmetros as guias do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

A Tabela 6 a seguir, mostra os limites de detecção e de quantificação dos analitos em condições normais (sem pré-concentração) e com pré-concentração.

Tabela 6 – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), sem e com pré-concentração, para os cátions estudados.

| | NH₄ | K | TI* | Ca | Na | Mg | Mn | Cr | Pb | Cd | Zn | Cu | Co | Ni |
|--|-----------------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 1,55 | 1,41 | 2,17 | 3,03 | 6,20 | 0,95 | 0,93 | 5,70 | 2,91 | 5,74 | 2,08 | 5,63 | 4,16 | 3,23 |
| LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 5,18 | 4,69 | 7,23 | 10,10 | 20,67 | 3,17 | 3,09 | 19,00 | 9,69 | 19,12 | 6,95 | 18,77 | 13,87 | 10,76 |
| Com pré-concentração (Sample Stacking - Força iônica) | | | | | | | | | | | | | | |
| | NH₄ | K | TI* | Ca | Na | Mg | Mn | Cr | Pb | Cd | Zn | Cu | Co | Ni |
| LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 3,69 | 4,75 | 6,86 | 9,12 | 19,35 | 3,09 | 2,82 | 18,59 | 9,69 | 12,87 | 4,99 | 15,63 | 8,14 | 7,74 |

* Tâio determinado na presença de ácido cítrico 1 mmol L⁻¹ no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1 mmol L⁻¹, pH 6).

Nota-se, na Tabela 6, que em condições normais (sem pré-concentração) os limites de detecção e de quantificação para todos os analitos foram na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). O menor LQ foi de $3,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o íon Mn^{2+} e o maior, de $20,67 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o íon Na^+ . A pré-concentração não forneceu valores de LQ na grandeza esperada. Esperavam-se valores menores para os LQ dos analitos. Apenas o LQ do íon NH_4^+ , pode-se dizer que diminuiu significativamente, de $5,18$ para $3,687 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Ilustrado na Tabela 7, está o tempo de migração médio ($n = 5$) para os íons analisados, o desvio padrão absoluto (S) para os T_m e o desvio padrão relativo (RSD) (%), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Tabela 7 – Faixa linear de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2), tempo de migração médio (T_m médio) para os cátions estudados.

| | Faixa Linear de Trabalho ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Equação da reta** | R^2 | T_m (min) | Desvio padrão absoluto (S) do T_m | RSD (%) do T_m |
|-----------------------|---|------------------------|--------|-------------|-------------------------------------|------------------|
| NH₄ | 5,18 - 2.217,05 | $y = 0,1462x - 0,1786$ | 0,9954 | 7,54 | 0,18 | 2,3 |
| K | 4,68 - 767,26 | $y = 0,0626x + 0,0516$ | 0,9989 | 7,96 | 0,12 | 1,5 |
| TI* | 7,23 - 122,31 | $y = 0,0073x + 0,0091$ | 0,9938 | 8,55 | 0,21 | 2,5 |
| Ca | 10,10 - 998,00 | $y = 0,0752x - 0,0532$ | 0,9974 | 9,08 | 0,14 | 1,5 |
| Na | 20,67 - 1.304,35 | $y = 0,0901x - 0,0708$ | 0,9978 | 9,44 | 0,17 | 1,8 |
| Mg | 3,17 - 1.234,57 | $y = 0,1097x - 0,0422$ | 0,9997 | 9,72 | 0,16 | 1,6 |
| Mn | 3,09 - 728,07 | $y = 0,0473x - 0,0307$ | 0,9982 | 9,96 | 0,20 | 1,9 |
| Cr | 19,00 - 1.538,46 | $y = 0,0157x - 0,0395$ | 0,9973 | 11,68 | 0,10 | 0,8 |
| Pb | 9,69 - 193,05 | $y = 0,0077x - 0,0157$ | 0,9990 | 12,10 | 0,20 | 1,6 |
| Cd | 19,12 - 711,74 | $y = 0,0103x - 0,0601$ | 0,9928 | 14,04 | 0,15 | 1,0 |
| Zn | 6,95 - 611,90 | $y = 0,0325x - 0,1356$ | 0,9904 | 20,09 | 0,22 | 1,1 |
| Cu | 18,77 - 786,80 | $y = 0,0288x - 0,1142$ | 0,9949 | 20,76 | 0,11 | 0,5 |
| Co | 13,87 - 848,46 | $y = 0,0659x - 0,3847$ | 0,9946 | 22,07 | 0,17 | 0,8 |
| Ni | 10,76 - 681,50 | $y = 0,0938x - 0,6156$ | 0,9942 | 25,34 | 0,23 | 0,9 |

* Tíio determinado na presença de ácido cítrico 1 mmol L⁻¹ no eletrólito de trabalho (MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1 mmol L⁻¹, pH 6).
 ** y = área do pico; x = concentração (mg L⁻¹).

Destaca-se que o método analítico desenvolvido apresentou boa linearidade, com amplas faixas lineares de trabalho, como por exemplo, de 5,18 – 2.217,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o NH_4^+ , de 19,00 – 1.538,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Cr^{3+} , de 20,67 – 1.304,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Na^+ e de 3,17 – 1.234,57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Mg^{2+} . Além disso, os coeficientes de determinação (R^2) das equações das retas para todos os analitos foi superior a 0,990, indicando portanto que as curvas obtidas apresentaram boa qualidade. Os coeficientes de variação calculados para os tempos de migração dos analitos apresentaram valores entre 0,5 – 2,5 %.

Comparada com outras técnicas de determinação e separação de íons inorgânicos, a eletroforese capilar (CE) destaca-se pelos tempos de análise relativamente reduzidos em relação à cromatografia iônica (IC, *Ion Chromatography*). Trabalhos publicados demonstram, por exemplo, a separação de apenas 6 cátions inorgânicos (Li^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ e Mg^{2+}) por IC com tempo de análise de 25 minutos (THOMAS *et al.*, 2002). Outros trabalhos demonstram a separação de 12 cátions inorgânicos (entre eles NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) por IC com tempo de análise de 35 minutos. Ainda nesta publicação, a faixa linear de trabalho foi reduzida para o NH_4^+ , em relação ao método proposto neste trabalho. Também para os analitos NH_4^+ , K^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Ni^{2+} os limites de quantificação foram relativamente maiores (ZENG *et al.*, 2006). Algumas metodologias para a análise de cátions inorgânicos por IC podem até apresentar limites de quantificação menores, mas o número de analitos analisados é limitado geralmente entre 4 a 8 (HODGE *et al.* 2000; THOMAS *et al.*, 2002; SHAW & HADDAD, 2004; BLAZEWICZ *et al.*, 2010).

Em relação à técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) a principal vantagem da CE são as amplas faixas lineares de trabalho e o maior número de analitos que podem ser analisados simultaneamente. A espectrometria de absorção atômica (AAS, *Atomic Absorption Spectrometry*), além das reduzidas faixas lineares de trabalho, apresenta um consumo de soluções maior em relação à CE. Também, por AAS não é possível realizar análises simultâneas de cátions (GOMEZ *et al.*, 2007; SAHAN *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2008; FEIST *et al.*, 2008; S.-JAVIED *et al.*, 2009).

4.3 Aplicação analítica

O estudo aplicado do método desenvolvido envolveu a análise dos íons inorgânicos em amostras reais e de matrizes distintas, como formulações fitoterápicas e formulações de fertilizantes minerais, na presença eletrólito de trabalho MES/His 30 mmol L⁻¹ e éter 18-coroa-6 1,5 mmol L⁻¹, em pH 6. Seguido da etapa sequencial na presença de ácido cítrico 1 mmol L⁻¹, para a análise de Tl⁺ mais especificamente. Os parâmetros operacionais foram exatamente iguais às condições otimizadas e desenvolvidas para a separação eletroforética dos 14 analitos, como já descrito na Tabela 4.

Como já citado (item 3.3.1), todas as amostras foram submetidas à digestão ácida (HNO₃/H₂O₂) e à extração (MeOH:H₂O). O objetivo da digestão ácida das amostras é prepará-las e adaptá-las para a análise, modificando o estado físico das amostras de sólido, em geral, para líquido. Com a digestão ácida as amostras passam a estar sob a forma mineralizada, ou seja, toda a matéria orgânica e mineral da composição da amostra é destruída. Sendo assim o que se determinada após a digestão ácida é a concentração total de elementos, como cátions metálicos, nas amostras.

Já o objetivo da extração com solventes é permitir a transferência de solutos, presentes na composição das amostras, para os solventes. O que ocorre então é a solubilização dos elementos, como cátions metálicos, das amostras para a solução de MeOH:H₂O, empregada para a extração. Sendo assim, o que se determina é a concentração de elementos não ligados quimicamente nas composições das amostras, ou seja, cátions sob a forma livre e, portanto, biodisponíveis. Como a extração não permite a mineralização das amostras, as concentrações dos elementos analisados e quantificados após a extração tendem a ser menores em relação às concentrações encontradas para a digestão ácida.

4.3.1 Amostras de plantas medicinais

As amostras das plantas analisadas, a *Persea americana* e a *Cyperus rotundus*, foram analisadas sob as duas formas de preparo, após a digestão ácida e a extração. A Tabela 8 a seguir, demonstra os cátions encontrados nas amostras das plantas e suas respectivas concentrações (mg/kg), nas duas formas de preparo.

Tabela 8 – Concentrações dos cátions encontrados nas amostras de plantas, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.

| Planta <i>Cyperus rotundus</i> (mg kg ⁻¹) | | | Planta <i>Persea americana</i> (mg kg ⁻¹) | | |
|---|----------|----------|---|----------|----------|
| | Digestão | Extração | | Digestão | Extração |
| NH₄ | 1.670 | N.D. | NH₄ | 3.880 | N.D.* |
| K | 24.860 | 8.630 | K | 2.620 | 1.680 |
| Ca | 4.000 | 490 | Ca | 5.360 | 60 |
| Na | 3.040 | 808 | Na | 4.900 | 1.850 |
| Mg | 2.690 | 1.404 | Mg | 4.000 | 20 |

Foram encontrados nas plantas medicinais analisadas apenas nutrientes. Nota-se que por digestão ácida as concentrações dos analitos estão mais elevadas. Isto está de acordo uma vez que por digestão ácida a amostra toda passa a estar sob forma mineralizada. Os resultados obtidos da extração indicam a presença destes nutrientes (K, Ca, Na e Mg) na forma livre, ou seja, não quimicamente ligada à estrutura vegetal das plantas, indicando a biodisponibilidade desses elementos nessas plantas.

A *Cyperus rotundus* apresentou uma concentração relativamente alta do elemento potássio de 24.860 mg kg⁻¹. Já a *Persea americana* apresentou uma concentração majoritária para o elemento cálcio de 5.360 mg kg⁻¹. A maior razão obtida entre a digestão e a extração para a *Cyperus rotundus* foi em relação a concentração do íon Ca²⁺, apresentando a razão (digestão/extração) de 8,16. Já a maior razão (digestão/extração) obtida para a *Persea americana* foi para o íon Mg²⁺, razão de 200. Isso indica que o elemento de maior concentração total presente na amostra, não é necessariamente o elemento de maior biodisponibilidade. Como por

exemplo, na *Persea americana* o cálcio é o elemento de maior concentração total, mas o elemento com maior biodisponibilidade na planta é o sódio.

A Figura 40 a seguir, ilustra os eletroferogramas das plantas medicinais analisadas após a digestão ácida.

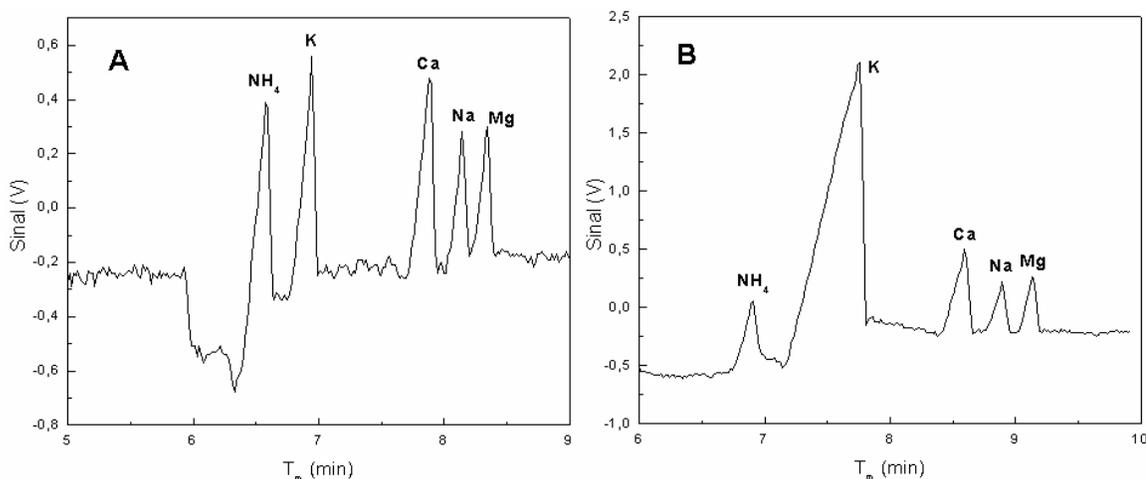


Figura 40: Eletroferograma dos nutrientes presentes nas amostras de *Persea americana* (A) e *Cyperus rotundus* (B), após digestão ácida.

Em seguida, as amostras da digestão ácida foram contaminadas com os analitos estudados, nas concentrações de 4 mg L^{-1} para Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni, de 1 mg L^{-1} para NH_4 , K, Ca, Na, Mg e Mn e analisadas posteriormente. Seguida da contaminação de 6 mg L^{-1} de TI, analisada na presença de ácido cítrico 1 mmol L^{-1} . A Figura 41 mostra os eletroferogramas da amostra de *Persea americana* contaminada com os analitos estudados.

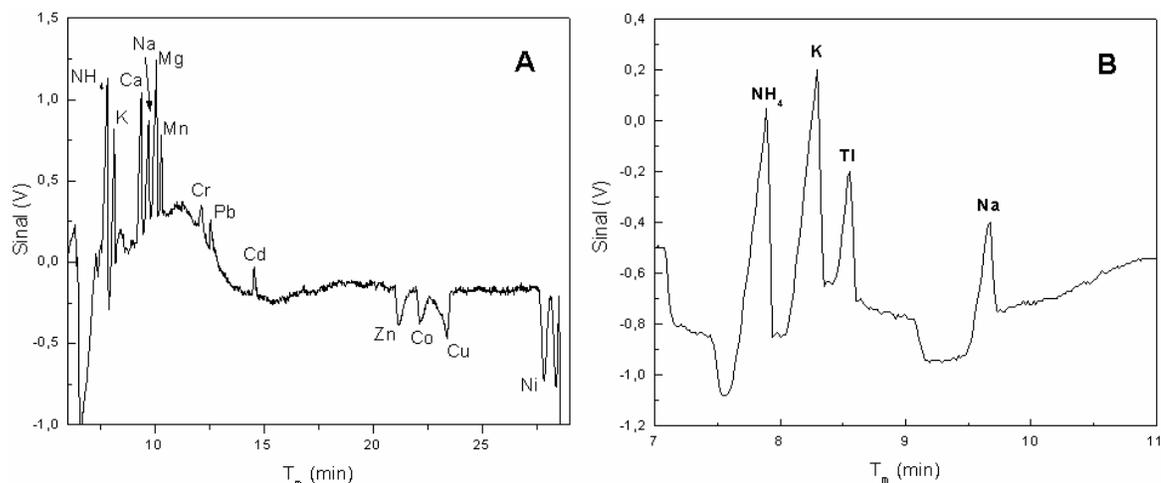


Figura 41: Amostra de *Persea americana* contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L^{-1} , NH_4 , K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L^{-1} (A), e com TI em 6 mg L^{-1} (B).

Como se pode observar, a determinação tanto de nutrientes como de elementos tóxicos nas plantas medicinais é possível pelo método eletroforético proposto.

4.3.2 Amostra de fitoterápico

A amostra do fitoterápico foi preparada também por digestão ácida e por extração, e analisada posteriormente sob estas duas formas. A Tabela 9 a seguir, demonstra os cátions encontrados no fitoterápico analisado e suas respectivas concentrações (mg/kg), nas duas formas de preparo.

Tabela 9 – Concentrações dos cátions encontrados na amostra do fitoterápico *Pholia magra*, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.

| Fitoterápico (mg kg^{-1}) | | |
|--------------------------------------|----------|----------|
| | Digestão | Extração |
| K | 10.600 | 3.290 |
| Ca | 3.250 | 216 |
| Na | 3.010 | 825 |
| Mg | 3.120 | 993 |
| Mn | 1.643 | N.D.* |

Como visto na Tabela 9, foram encontrados no fitoterápico analisado nutrientes como K, Ca, Na, Mg e Mn. Nota-se também que por digestão ácida as concentrações dos analitos estão mais elevadas, pois toda amostra foi mineralizada. Os resultados obtidos da extração indicam a presença de nutrientes como K, Ca, Na e Mg na forma livre, ou seja, estão biodisponíveis na formulação, portanto, sob forma não ligada à estrutura vegetal da planta do fitoterápico, e o elemento Mn não foi detectado nesta forma.

A Pholia magra apresentou uma concentração relativamente alta do elemento potássio de $10.600 \text{ mg kg}^{-1}$. A maior razão obtida entre a digestão e a extração para o fitoterápico foi em relação a concentração do íon Ca^{2+} , apresentando a razão (digestão/extração) de 15,05. As demais razões foram na ordem de 3. Para o fitoterápico o elemento de maior concentração total presente na amostra, o íon K^+ , é também o elemento de maior biodisponibilidade.

A Figura 42 a seguir, ilustra o eletroferograma do fitoterápico analisado após a digestão ácida.

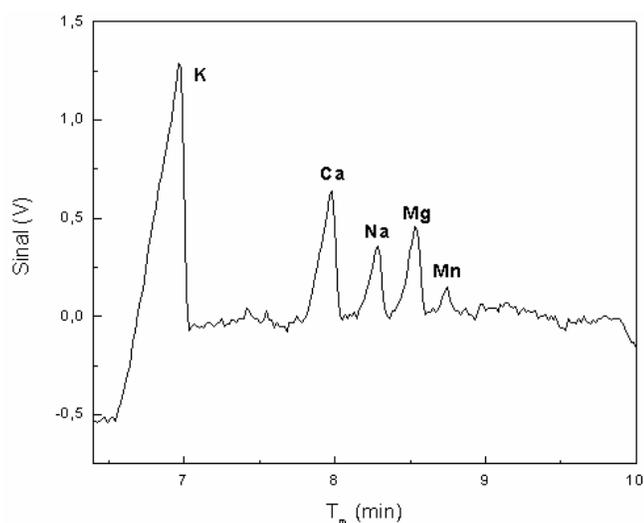


Figura 42: Eletroferograma dos nutrientes presentes na amostra do fitoterápico Pholia magra, após digestão ácida.

Em seguida, a amostra da digestão ácida foi contaminada com os analitos estudados, nas concentrações de 4 mg L^{-1} para Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni, de 1 mg

L⁻¹ para NH₄, K, Ca, Na, Mg e Mn e analisada posteriormente. Seguida da contaminação de 6 mg L⁻¹ de TI. A Figura 43 mostra os eletroferogramas da amostra de *Pholia magra* contaminada com os analitos estudados.

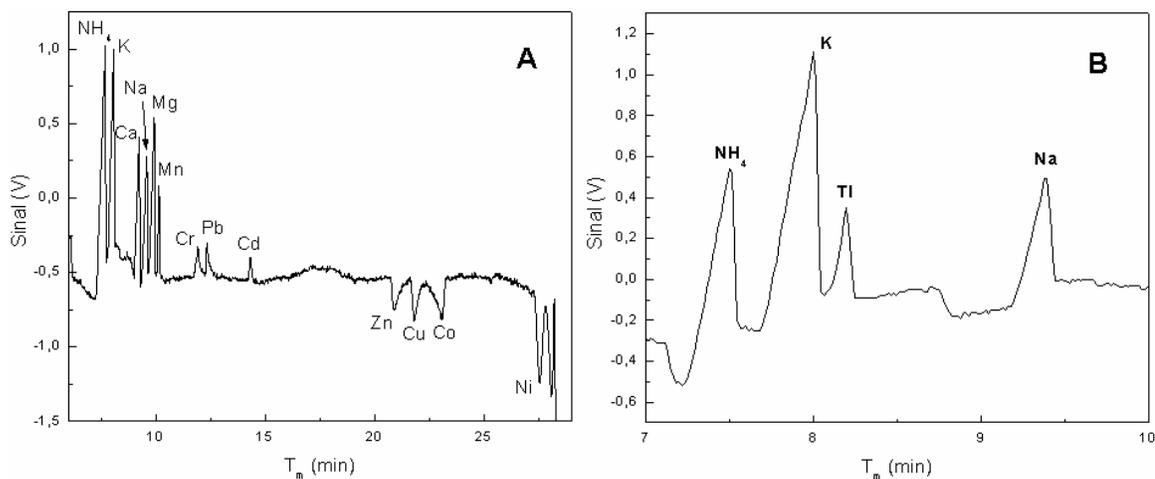


Figura 43: Amostra de *Pholia magra* contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L⁻¹, NH₄, K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L⁻¹ (A), e com TI em 6 mg L⁻¹ (B).

4.3.3 Amostras de fertilizante sólido e líquido

As amostras dos fertilizantes foram analisadas também posteriormente sob as duas formas de preparo, digestão ácida e extração. A Tabela 10 a seguir, demonstra os cátions encontrados nos fertilizantes analisados e suas respectivas concentrações (mg kg⁻¹), nas duas formas de preparo.

Tabela 10 – Concentrações dos cátions encontrados nas amostras dos fertilizantes sólido e líquido, por digestão ácida e por extração. *N.D. Analito não detectado.

| Fertilizante sólido (mg kg ⁻¹) | | | Fertilizante líquido (mg kg ⁻¹) | | |
|--|----------|----------|---|----------|----------|
| | Digestão | Extração | | Digestão | Extração |
| NH₄ | 75.790 | 29.810 | NH₄ | 267 | N.D.* |
| K | 17.070 | 715 | K | 20.740 | 9.300 |
| Ca | 7.070 | 200 | Ca | 982 | 260 |
| Na | 4.540 | 686 | Na | 4.880 | 1.075 |
| Mg | 10.070 | 350 | Mn | 14.850 | 6.880 |

Como pode-se observar na Tabela 10, foram encontrados no fertilizante sólido analisado nutrientes como K, Ca, Na, Mg, já no fertilizante líquido, além dos nutrientes K, Ca e Na, encontrou-se o Mn. Nota-se também que por digestão ácida as concentrações dos analitos estão mais elevadas em relação à extração, pois como já citado toda amostra foi mineralizada. Os resultados obtidos da extração indicam a presença destes nutrientes (K, Ca, Na, Mg e Mn) sob forma livre na composição das formulações químicas dos fertilizantes.

O fertilizante sólido apresentou uma concentração relativamente alta do íon amônio (NH₄⁺) de 75.790 mg kg⁻¹. Já o fertilizante líquido apresentou uma concentração majoritária para o íon potássio (K⁺) de 20.740 mg kg⁻¹. A maior razão obtida entre a digestão e a extração para o fertilizantes sólido foi em relação a concentração do íon Ca²⁺, apresentando a razão (digestão/extração) de 35,35. Já a maior razão (digestão/extração) obtida para o fertilizante líquido foi para o íon Na⁺, razão de 4,53.

Tanto para o fertilizante sólido quanto para o fertilizante líquido, os cátions de maior concentração total também foram os de maior biodisponibilidade nas formulações, sendo eles o NH₄⁺ e o K⁺, respectivamente.

A Figura 44 a seguir, ilustra os eletroferogramas dos fertilizantes analisados após a digestão ácida.

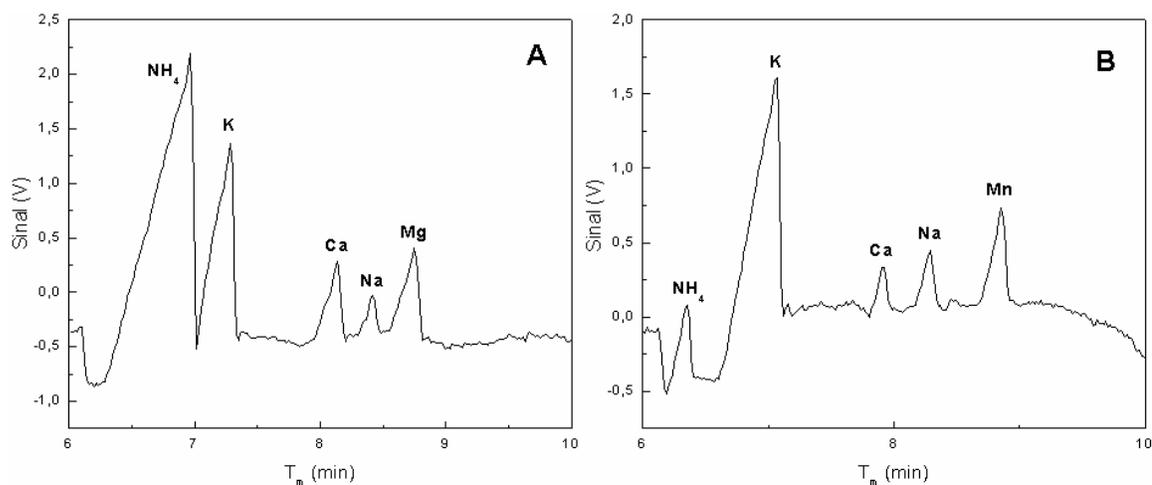


Figura 44: Eletroferograma dos nutrientes presentes na amostra do fertilizante sólido (A) e do fertilizante líquido (B), após digestão ácida.

Em seguida, as amostras da digestão ácida foram contaminadas com os analitos estudados, nas concentrações de 4 mg L^{-1} para Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni, de 1 mg L^{-1} para NH₄, K, Ca, Na, Mg e Mn e analisadas posteriormente. Seguida da contaminação de 6 mg L^{-1} de TI. A Figura 45 mostra os eletroferogramas da amostra de fertilizante líquido contaminada com os analitos estudados (exceto o TI) e da amostra de fertilizante sólido contaminada com TI.

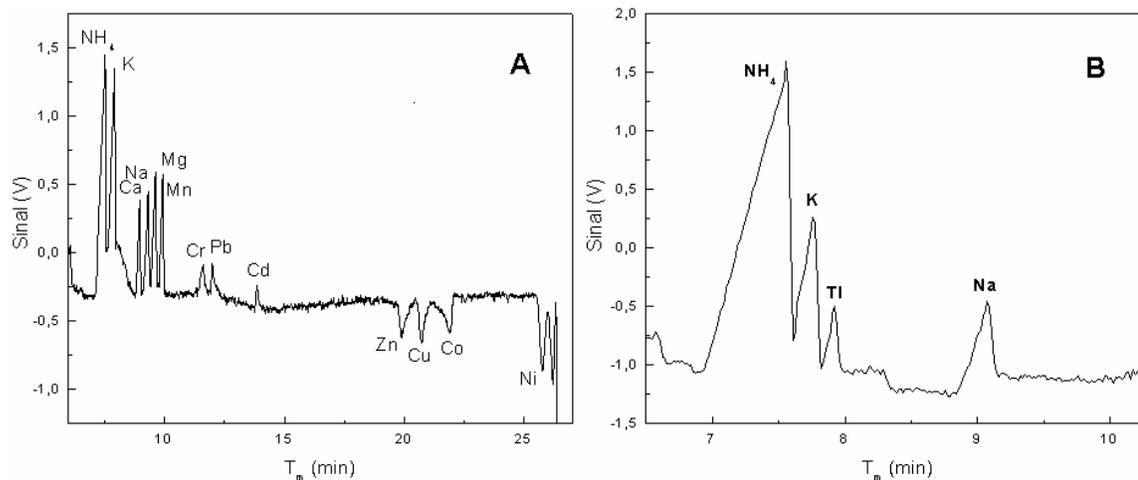


Figura 45: Amostra de fertilizante líquido contaminada com Cr, Pb, Cd, Zn, Cu, Co e Ni em 4 mg L⁻¹, NH₄, K, Ca, Na, Mg e Mn em 1 mg L⁻¹ (A), e amostra de fertilizante sólido contaminada com TI em 6 mg L⁻¹ (B).

Compete ao MAPA, a regulamentação da legislação referente aos limites mínimos exigidos de micro ou macronutrientes presentes na composição dos fertilizantes em geral, também os limites máximos permitidos de metais tóxicos e/ou contaminantes nessas formulações minerais.

Como não foram detectadas presenças de contaminantes nas formulações minerais em ambos fertilizantes analisados, pode-se fazer uma aproximação dos limites quantificáveis que poderiam ser detectados nas amostras, utilizando a metodologia desenvolvida e proposta neste trabalho. Supondo que o preparo da amostra partisse de uma amostragem de 5g de fertilizante, num volume final de diluição igual a 50 mL, e que depois de analisada fornecesse concentrações dos analitos iguais aos limites de quantificação encontrados neste método, pode-se calcular as quantidades de cada analito que estariam presentes nas formulações do fertilizante sólido e líquido, em mg kg⁻¹, e estimar os LQ dos analitos para as amostras.

A Tabela 11 traz os limites de quantificação (mg kg⁻¹) para as amostras de fertilizante sólido e líquido, juntamente com os valores mínimos exigidos para os nutrientes e os valores máximos permitidos para os contaminantes nas formulações de fertilizantes sólido e líquido, segundo o MAPA.

Tabela 11 – Limites de quantificação para as amostras de fertilizante sólido e líquido, comparados a Legislação do MAPA.

| Macronutrientes | LQ (mg kg⁻¹) | Mínimo (mg kg⁻¹) (líquido) |
|------------------------|--------------------------------|--|
| Ca | 4,00 | 100.000 |
| Mg | 0,80 | 80.000 |
| N | 0,70 | 100.000 |
| K | 1,80 | 83.015 |
| Na | 4,80 | |
| Micronutrientes | LQ (mg kg⁻¹) | Mínimo (mg kg⁻¹) (sólido^a; líquido^b) |
| Mn | 1,70 | 500 ^a ; 100.000 ^b |
| Zn | 4,50 | 1.000 ^a ; 100.000 ^b |
| Co | 8,20 | 50 ^a ; 60.000 ^b |
| Cu | 11,90 | 500 ^a ; 80.000 ^b |
| Contaminantes | LQ (mg kg⁻¹) | Máximo (mg kg⁻¹) (sólido) |
| Cd | 21,50 | 20,00 |
| Cr | 9,90 | 200,00 |
| Pb | 20,10 | 100,00 |
| TI | 14,80 | - |
| Ni | 6,30 | - |

Tendo como base a legislação vigente (MAPA), o método proposto neste trabalho pode ser aplicado tanto para a determinação de micronutrientes quanto de macronutrientes para as formulações minerais de fertilizantes líquidos, uma vez que os limites quantificáveis destes nutrientes nas amostras estão em concentrações inferiores aos valores mínimos exigidos pelo MAPA.

Ao mesmo tempo, a metodologia desenvolvida para a análise dos 14 cátions inorgânicos pode ser aplicada tanto para a determinação de micronutrientes quanto de contaminantes (metais tóxicos) para as formulações minerais de fertilizantes sólidos, ao passo que os limites quantificáveis destes nutrientes e contaminantes nas amostras também estão em concentrações inferiores aos valores mínimos

exigidos, para os nutrientes, e inferiores aos máximos permitidos, para os contaminantes, segundo o MAPA. Exceto para o contaminante Cd que apresentou LQ de $21,50 \text{ mg kg}^{-1}$ nas amostras, e o limite máximo permitido nos fertilizantes sólidos é de $20,00 \text{ mg kg}^{-1}$.

5 CONCLUSÃO

Como proposto, a separação eletroforética de 14 analitos (amônio (NH_4^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), manganês (Mn^{2+}), tálio (Tl^+), cromo (Cr^{3+}), chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e níquel (Ni^{2+})) utilizando a eletroforese capilar de zona (CZE, *capillary zone electrophoresis*) com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , *capacitively coupled contactless conductivity detection*) foi possível com a utilização do eletrólito de trabalho MES/His 30 mmol L^{-1} na presença de éter 18-coroa-6 $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 6. Seguida de uma determinação sequencial, na presença de ácido cítrico 1 mmol L^{-1} , necessária para a análise de tálio e potássio de forma seletiva. A separação destes 14 cátions simultaneamente bem como a separação de K^+ e Tl^+ ainda não foram descritas na literatura.

A metodologia desenvolvida para os 14 analitos mostrou-se adequada para a determinação dos cátions inorgânicos estudados apresentando boa linearidade, com amplas faixas lineares de trabalho de $5,18$ a $2.217,06 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $19,00$ a $1.538,46 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os íons NH_4^+ e Cr^{3+} , respectivamente; apresentando também limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os analitos. Além disso, os coeficientes de determinação (R^2) das equações das retas para todos os analitos foi superior a $0,990$, indicando a obtenção de curvas analíticas confiáveis. Os coeficientes de variação calculados para os tempos de migração dos analitos apresentaram valores entre $0,5 - 2,5 \%$.

Embora os ganhos de sensibilidade utilizando técnicas de pré-concentração *on-line*, para este trabalho, não tenham sido da grandeza esperada, estas técnicas são de grande valia para a eletroforese capilar. Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos e aplicações, adequando a escolha da estratégia aos tipos de analitos a serem determinados e ao aumento de sensibilidade necessário para a execução das análises.

A metodologia desenvolvida por CZE- C^4D além de gerar resultados práticos e confiáveis, permite o *screening* de amostras em relação à presença de cátions

inorgânicos. Ainda pode ser aplicada para a determinação e a quantificação tanto de micronutrientes quanto de contaminantes (ou metais pesados) nas formulações minerais (fertilizantes sólidos e líquidos) e nas formulações fitoquímicas (plantas medicinais e fitoterápicos), seguindo a legislação vigente (MAPA e ANVISA).

Sendo assim, o método proposto destaca-se quando comparado à outras técnicas de determinação e separação de íons inorgânicos, ao passo que gerou tempos de análise relativamente reduzidos, baixo consumo de soluções, boa resolução e sensibilidade para os analitos estudados, e permitindo ainda a determinação simultânea de um grande número de analitos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K. A.; MARTINS, L.; CARDOSO, D. Preparação e propriedades de zeólitas faujasita contendo cátions amônio. **Química Nova**, v. XY, n. 00, p. 1-5, 2010.

ANTUNES, A. M.; VOLPE, P. L. O. Extração do cátion potássio de uma solução saturada de cloreto de sódio usando o método da membrana líquida. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 440-443, 1995.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

BERTAGNOLLI, D. C. **Migração de metais por interação das embalagens em soluções parenterais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2008.

BLAZEWICZ, A.; DOLLIVER, W.; SIVSAMMEYE, S.; DEOL, A.; RANDHAWA, R.; ORLIEZ-SZEZESNA, G.; BLAZEWICZ, R. Determination of cadmium, cobalt, copper, iron, manganese, and zinc in thyroid glands of patients with diagnosed nodular goitre using ion chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 34-38, 2010.

CARVALHO, L. M. de; SPENGLER, C.; LIMA, A. P. S. de; RAABE, A.; MARTINI, M.; NASCIMENTO, P. C. do; BOHRER D. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2203-2208, 2009.

CHANG, X.; LUO, H.; CUI, Y.; ZHU, X.; ZHAI, Y.; HU, Z.; HE, Q. ICP-OES determination of trace metals ions after preconcentration by 4-(8-hydroxy-5-quinolyazo)naphthalenesulfonic acid modified silica gel. **Journal of Molecular Structure**, v. 891, p. 45-49, 2008.

CHEN, C. C.; LI, L. G.; SI, Y. J.; LI, Y. P. AC impedance characteristics of capacitively coupled contactless conductivity detector cell in capillary electrophoresis. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 6959-6962, 2009.

CHIARI, M. Enhancement of selectivity in capillary electrophoretic separations of metals and ligands through complex formation. **Journal of Chromatography A**, v. 805, p. 1-15, 1998.

CONRADI, S.; VOGT, C.; WITTRISCH, H.; KNOBLOCH, G.; WERNER, G. Capillary electrophoretic separation of metal ions using complex forming equilibria of different stabilities. **Journal of Chromatography A**, v. 745, p. 103-109, 1996.

DAL BOSCO, S. M.; JIMENEZ, R. S.; CARVALHO, W. A. Aplicação de zeólita natural escolecita na remoção de metais pesados de efluentes industriais: competição entre os cátions e processo de dessorção. **Eclética química**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2004.

DANIELI, R. **Transferência de calor e controle de temperatura em tubos capilares utilizados em eletroforese capilar**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

E-ESCOLA, Instituto Superior Técnico; Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/quimica>>. Acessado em: 01 outubro 2010.

EPA, United States Environmental Protection Agency, Norma EPA 3052 e 3050B; Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>> Acessado em: 22 novembro 2010.

ESHAGHI, Z.; GHOLIZADEH, M. The effect of magnetic field on the stability of (18-crown-6) complexes with potassium ion. **Talanta**, v. 64, p. 558-561, 2004.

FAVARON, R. **Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação de zinco, cobre, chumbo, níquel, estanho e cromo em águas de efluentes industriais de galvanoplastia**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

FEIST, B.; MIKULA, B.; PYTLAKOWSKA, K.; PUZIO, B.; BUHL, F. Determination of heavy metals by ICP-OES and F-AAS after preconcentration with 2,2'-bipyridyl and erythrosine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1122-1129, 2008.

FRANÇOIS, C.; MORIN, Ph.; DREUX, M. Effect of the concentration of 18-crown-6 added to the electrolyte upon the separation of ammonium, alkali and alkaline-earth cations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 706, p. 535-553, 1995.

FRANÇOIS, C.; MORIN, Ph.; DREUX, M. Separation of transition metal cations by capillary electrophoresis; Optimization of complexing agent concentrations (lactic acid and 18-crown-6). **Journal of Chromatography A**, v. 717, p. 393-408, 1995.

GARMATZ, J. C. **Determinação de metais como contaminantes em formulações de eritropoetina empregando métodos voltamétricos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2007.

GOMEZ, M. R.; CERUTTI, S.; SAMBRA, L. L.; SILVA, M. F.; MARTÍNEZ, L. D. Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1060-1064, 2007.

HARRIS, D. C.; **Química Analítica Quantitativa**, 6. ed., Rio de Janeiro, RJ, Ed. LTC, 2005, cap. 28, p. 684-700.

HODGE, E. M.; MARTINEZ, P.; SWEETIN, D. Determination of inorganic cations in brine solutions by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 884, p. 223-227, 2000.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**; DOQ-CGCRE-08, Revisão 02 – Junho, 2007.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JOHNSTON, S. E.; FADGEN, K. E.; TOLLEY, L. T.; JORGENSON, J. W. Expanded electrical model of a contactless conductivity detector: Development and verification. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 148-157, 2005.

JUN, C.; FANGJUN, H.; PING, C. Numerical study on sample stacking in capillary electrophoresis. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25, n. 2, p. 183-188, 2007.

JUN, C.; FANGJUN, H.; PING, C. Numerical analysis on the influence factors of sample stacking in capillary electrophoresis. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25, n. 4, p. 482-485, 2007.

KIM, K.; BRUCKENSTEIN, S.; HILLMAN, A. R. Kinetics of redox switching of prussian blue films in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solutions and potassium ions using the electrochemical quartz crystal microbalance. **The Electrochemical Society**, 2006.

KOK, W. Capillary electrophoresis: Instrumentation and Operation. **Chromatographia**, Supplement v. 51, 2000.

KUBAN, P.; HAUSER, P. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.

KUBAN, P.; KARLBERG, B.; KUBAN, P.; KUBAN, V. Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection. **Journal of Chromatography A**, v. 964, p. 227-241, 2002.

KUBAN, P.; KUBAN, P.; KUBAN, V. Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations complexation with ethylenediaminetetraacetic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 75-80, 1999.

KUBAN, P.; KUBAN, P.; KUBAN, V. Simultaneous determination of inorganic and organic anions, alkali, alkaline earth and transition metal cations by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3725-3734, 2002.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S.; **Capillary electrophoresis: principles and practice**. Reutlingen, Germany, Ed. Springer-Verlag, 1993.

LOPES, F. S.; ANTUNES Jr., O.; GUTZ, I. G. R. Fully electrochemical hyphenated flow system for preconcentration, cleanup, stripping, capillary electrophoresis with stacking and contactless conductivity detection of trace heavy metals. **Electrochemistry Communications**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2010.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.

MARTINI, M. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação de fármacos sintéticos em formulações fitoterápicas emagrecedoras empregando eletroforese capilar**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2010.

MATTIAS, J. L. **Metais pesados em solos sob aplicação de dejetos líquidos de suínos em duas microbacias hidrográficas de Santa Catarina**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2006.

McGRAW-HILL HANDBOOKS; **Dean's Analytical Chemistry Handbook**, 2nd ed., Pradyot Patnaik, 2004.

METAIS PESADOS E SEUS EFEITOS TÓXICOS; Disponível em: <<http://www.mundodoquimico.hpg.com.br>>. Acessado em: 20 agosto 2010.

MORAES, M. de L. L. de; MORAES, S. L. de; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

MORAES, M. de L. L. de; TAVARES, M. F. M.; PEREIRA, E. A. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar. Parte 2. Manipulação da velocidade da fase dispersa/secundária. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 466-470, 2010.

NESTERENKO, E. P.; NESTERENKO, P. N.; PAULL, B. Simultaneous separation of inorganic anions and metal-citrate complexes on a zwitterionic stationary phase with on-column complexation. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 62-69, 2008.

OEHRLE, S. A. Controlled changes in selectivity of cation separations by capillary electrophoresis using various crown-ether additives. **Journal of Chromatography A**, v. 745, p. 87-92, 1996.

ONTARIO, Ministry of The Environment; Disponível em: <<http://www.ene.gov.on.ca>>. Acessado em: 13 setembro 2010.

PADARAUSKAS, A.; SCHWEDT, G. Capillary electrophoresis in metal analysis Investigations of multi-elemental separation of metal chelates with aminopolycarboxylic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 773, p. 351-360, 1997.

PADARAUSKAS, A.; SCHWEDT, G. New electrolyte system for the determination of ammonium, alkali and alkaline earth cations by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, p. 159-165, 1998.

PLANTAMED, Plantas, ervas medicinais e fitoterápicos; Disponível em: <<http://www.plantamed.com.br>>. Acessado em: 3 outubro 2010.

PHARMATIVA, Drogaria e manipulação; Disponível em: <<http://www.pharmativa.com.br>>. Acessado em: 1 outubro 2010.

POLESELLO, S.; VALSECCHI, S. M. Electrochemical detection in capillary electrophoresis analysis of inorganic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 834, p. 103-116, 1999.

QU, F.; LIN, J.; CHEN, Z. Simultaneous separation of nine metal ions and ammonium with nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, p. 217-221, 2004.

QUIRINO, J. P.; TERABE, S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 119-135, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, . 4, p. 771-780, 2004.

RIEKKOLA, M.-L.; JUSSILA, M.; PORRAS, S. P.; VALKO, I. E. Non-aqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 155-170, 2000.

SAHAN, Y.; BASOGLU, F.; GÜCER, S. ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 395-399, 2007.

SARMINI, K.; KENNDLER, E. Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 792, p. 3-11, 1997.

SCHNEIDER, A. B. **Determinação sequencial de cromo, tálio, cádmio, chumbo, cobre e antimônio em concentrado polieletrólítico para hemodiálise por voltametria de redissolução através de um gradiente de pH.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2010.

SHAW, M. J.; HADDAD, P. R. The determination of trace metal pollutants in environmental matrices using ion chromatography. **Environment International**, v. 30, p. 403-431, 2004.

SHI, Y.; FRITZ, J. S. Separation of metal ions by capillary electrophoresis with a complexing electrolyte. **Journal of Chromatography**, v. 640, p. 473-479, 1993.

SHINZATO, M. C. Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. **Revista do Instituto Geológico**, São Paulo, v. 27-28 (1/2), p. 65-78, 2007.

SIMPSON Jr., S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 504-541, 2008.

SILVA, J. A. F. da; LAGO, C. L. do. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.70, p.4339-4343, 1998.

SILVA, J. A. F. da. **Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética**, Tese de Doutorado em Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, J. A. F. da; GUZMAN, N.; LAGO, C. L. do. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis; Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 249-258, 2002.

SILVA, J. A. F. da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, J. A. F. da; RICELLI, N. L.; CARVALHO, A. Z.; LAGO, C. L. do. Improved separation of IA and IIA metal cations in matrices with high sodium concentration by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 14, n. 2, p. 265-268, 2003.

S.-JAVIED, MEHMOOD, T.; CHAUDHRY, M. M.; TUFAIL, M.; IRFAN, N. Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 94-99, 2009.

SOLÍNOVÁ, V.; KASICKA, V. Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1743-1762, 2006.

SPENGLER, C. **Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2009.

TAKAYANAGI, T. Analysis of chemical equilibria in aqueous solution related with separation development using capillary zone electrophoresis. **Chromatography**, v. 26, n. 1, 2005.

TAN, F.; YANG, B.; GUAN, Y. Determination of heavy metal ions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection after field-amplified sample injection. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 955-958, 2005.

TANYANYIWA, J.; HAUSER, P. C. High-voltage contactless conductivity detection of metal ions in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3781-3786, 2002.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

THOMAS, D. H.; REY, M.; JACKSON, P. E. Determination of inorganic cations and ammonium in environmental waters by ion chromatography with a high-capacity cation-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 956, p. 181-186, 2002.

TIMERBAEV, A. R. Metal ion analysis by capillary electrophoresis: New possibilities in separation and detection. **Journal Capillary Electrophoresis**, v. 2, n. 1, p. 14-23, 1995.

TIMERBAEV, A. R. Separation of metal ions by capillary electrophoresis: An understanding of the basic principles. **Journal Capillary Electrophoresis**, v. 2, n. 4, p. 165-174, 1995.

TIMERBAEV, A. R.; SEMENOVA, O. P.; FRITZ, J. S. Advanced possibilities on multi-element separation and detection of metal ions by capillary zone electrophoresis using precapillary complexation I. Separation aspects. **Journal of Chromatography A**, v. 756, p. 300-306, 1996.

TIMERBAEV, A. R. Strategies for selectivity control in capillary electrophoresis of metal species. **Journal of Chromatography A**, v. 792, p. 495-518, 1997.

WANG, L.-S.; ZHANG, S.-F.; DANG, Z.; LIU, X.-X.; HUANG, X.-J.; XIAO, M.-W.; CHEN, Z.-G. Running buffers for determination of chromium(VI)/(III), cobalt(II) and

zinc(II) in complex matrices by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Talanta**, v. 72, p. 1342-1347, 2007.

WUERSIG, A.; KUBAN, P.; KHALOO, S. S.; HAUSER, P. C. Rapid electrophoretic separations in short capillaries using contactless conductivity detection and a sequential injection analysis manifold for hydrodynamic sample loading. **Analyst**, v. 131, p. 944-949, 2006.

YAMABE, T.; HORI, K.; AKAGI, K., FUKUI, K. Stability of crown ether complexes; A MO theoretical study. **Tetraedron**, v. 35, p. 1065-1072, 1979.

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 563-567, 1998.

ZEMANN, A. J. Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2125-2137, 2003.

ZENG, W.; CHEN, Y.; CUI, H.; WU, F.; ZHU, Y.; FRITZ, J. S. Single-column method of ion chromatography for the determination of common cations and some transition metals. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, p. 68-72, 2006.

ZHANG, L.; KHALOO, S. S.; KUBAN, P.; HAUSER, P. C. Analysis of electroplating baths by capillary electrophoresis with high voltage contactless conductivity detection. **Measurement Science and Technology**, v. 17, p. 3317-3322, 2006.

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](#)