

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Esse exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Maria de Fátima Carvalho
Costa e aprovado pela Comissão Julgadora.

25.03.91 .

Kenneth E. Collins

Prof. Dr. Kenneth E. Collins

"DERIVATIZAÇÃO PÓS-COLUNA DE ESPÉCIES
HIDROLÍTICAS DE Cr(III) "

MARIA DE FÁTIMA C. COSTA

ORIENTADOR: PROF. DR. KENNETH E. COLLINS

TESE DE MESTRADO

1990

2019104434

À meus pais com
muita gratidão e amor.

À Gutierre pela ajuda,
compreensão e incentivo.

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Prof. Kenneth E. Collins, pela orientação e incentivo.
- À Profa. Carol H. Collins, pelas discussões e sugestões.
- À Universidade Federal da Paraíba - UFPb, pela minha liberação e ajuda financeira para realização deste trabalho.
- À todos os colegas de grupo.
- À todos os professores e demais colegas do Departamento de Química Analítica, de maneira especial a Bell (II), pela cooperação e ajuda.
- À Diretoria dos Institutos de Química da UNICAMP, pela oportunidade concedida.
- À Elza, Kátia e Cida pela amizade.
- Ao Joãozinho, pela ajuda no laboratório.

ÍNDICE GERAL

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA.....	01
1.2. ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III).....	05
1.2.1. Métodos de preparação.....	05
1.2.2. Estrutura.....	07
1.2.3. Separação.....	12
1.3. OBJETIVOS.....	19
1.4. DERIVATIZAÇÃO PRÉ- E PÓS-COLUNA.....	21
1.4.1. A técnica pré-coluna.....	21
1.4.2. A técnica pós-coluna.....	22
1.4.3. Comparação entre as duas técnicas.....	24
1.5. TIPOS DE REATORES PÓS-COLUNA.....	24
1.5.1. Reatores Tubulares Abertos (RTA).....	26
1.5.2. Reatores Recheados Homogêneos (RRHo) e Heterogêneos (RRHe).....	27

1.5.3. Reatores Tubulares para fluxo segmentado (RTFS).....	29
1.5.4. Aplicação de Reatores pós-coluna.....	31

CAPÍTULO 2

2. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
2.1. MATERIAIS.....	34
2.1.1. Reagentes.....	34
2.1.2. Solução de Cr(VI) 1000 µg/mL.....	35
2.1.3. Solução de Cr(III) 1000 µg/mL.....	35
2.1.4. Mistura de espécies de Cr(III).....	36
2.1.5. Reagentes Pós-coluna.....	37
a) Sulfato cérico.....	37
b) 1,5-difenilcarbazida (DFC).....	38
2.1.6. Fases Móveis.....	40
2.1.7. A Resina AG 50W x-4.....	41
2.2. COLUNA.....	43
2.3. INSTRUMENTOS.....	44
2.3.1. Sistema Cromatográfico.....	44
2.3.2. Sistema de Injeção em Fluxo Contínuo.....	46
2.3.3. Sistema Pós-Coluna.....	47
2.3.4. Detectores Espectrofotométricos.....	49

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS.....	51
3.1. SEPARAÇÃO DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA A 415nm.....	51

3.2. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(VI) POR REAÇÃO COM A 1,5-DIFENILCARBAZIDA COM INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (IFC).....	54
3.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(III) POR OXIDAÇÃO COM Cr(IV) E REAÇÃO COM 1,5-DIFENILCARBAZIDA EM SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (IFC).....	54
3.4. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO Cr(III), MONÔMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.....	57
3.5. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.....	64

CAPÍTULO 4

4. DISCUSSÕES DOS RESULTADOS.....	73
4.1. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(VI) E Cr(III) POR IFC.....	73
4.2. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO Cr(III) MONÔMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.....	75
4.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) MONÔMERO, DÍMERO E TRÍMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.....	76

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	82

R E S U M O

- Derivatização Pós-Coluna de Espécies Hidrolíticas de Cr(III).

Foi desenvolvido um método rápido e sensível para determinação de espécies hidrolíticas de Cr(III) - tais como monômero, dímero e trímero - presentes em concentrações baixas em soluções aquosas.

Para a separação destas espécies utilizamos uma coluna de Kel-F de 0,4 x 5cm, recheada com uma resina de troca catiônica fortemente ácida, Bio Rad AG 50W x-4 (<400 mesh). Os eluentes usados foram $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,3; 0,5 e 1,0 mol.L⁻¹, todos em ácido perclórico pH 2,0, que eluem as espécies monomérica, dimérica e trimérica respectivamente.

A detecção e a quantificação das espécies hidrolíticas de Cr(III) foram obtidas através de uma reação pós-coluna realizada pelo acoplamento da coluna com um sistema de fluxo contínuo, no qual foram adicionados ao efluente da coluna os reagentes pós-coluna, uma solução de Ce(IV) para a oxidação do Cr(III) para Cr(VI) e uma solução do agente complexante, a 1,5-difenilcarbazida (DFC). O complexo resultante, Cr(VI) - DFC, foi detectado espectrofotometricamente a 540nm. Os cromatogramas assim obtidos foram comparados com os obtidos sem a reação pós-coluna (detecção a 415nm).

O processo de reação pós-coluna produz um alargamento da banda provocado por efeitos extra-coluna (diâmetro interno do tubo reator, tempo de residência, etc.), mas reduz sensivelmente o limite de detecção das espécies hidrolíticas de Cr(III).

A B S T R A C T

- POST - COLUMN DERIVATIZATION OF HYDROLYTIC SPECIES OF Cr(III).

A fast and sensitive method for the determination of hydrolytic species of Cr(III) — such as monomer, dimer and trimer — present in low concentrations in aqueous solutions was developed.

For the separation of these species, a column of Kel-F with dimensions of 0,4 x 5cm, packed with a strong acid cation-exchange resin, Bio Rad AG 50W x-4 (<400 mesh) was utilized. The eluent used was $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ at concentrations of 0,3; 0,5 and 1,0 mol.L^{-1} , all in perchloric acid, pH 2,0, which elute the monomeric, the dimeric and the trimeric species, respectively.

The detection and quantification of the hydrolytic species of Cr(III) were carried out through a post-column reaction by coupling the column with a continuous flow system wherein the following post-column reagents were added to the effluent: a Ce(IV) solution to oxidize the Cr(III) to Cr(VI) and a complexing agent, 1,5-diphenylcarbazide (DPC). The resulting complex, Cr(VI) - DPC was detected spectrophotometri-

cally at 540nm. The chromatograms thus obtained were compared with those obtained without the post-column reaction (detection at 415nm).

The post-column reaction process gives rise to a band broadening caused by extra-column effects (internal diameter of the reactor tube, residence time, etc.), but appreciably reduces the detection limit of the hydrolytic species of Cr(III).

C A P Í T U L O 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

A cromatografia é uma técnica de separação, quantificação e identificação de componentes de uma amostra, sendo que no caso de identificação ela não é totalmente confiável. Nesta técnica, os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases; uma delas é a fase estacionária e a outra é a fase móvel a qual percola através da fase estacionária. O processo cromatográfico ocorre como um resultado de repetidas etapas de sorção/desorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária e a separação é devida a diferenças nas constantes de distribuição dos componentes individuais da amostra.

A fase móvel pode ser gasosa ou líquida. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás, enquanto na cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido.

Vários materiais têm sido usados como fase estacionária, de acordo com o tipo de amostra que se deseja separar. Assim, pode-se classificar a cromatografia líquida em cinco categorias; a cromatografia por partição, por adsorção, por

exclusão, por bioafinidade e por troca iônica.

Neste capítulo será considerada apenas um tipo de cromatografia líquida em coluna, a cromatografia por troca iônica, já que foi este o tipo de cromatografia empregado neste trabalho.

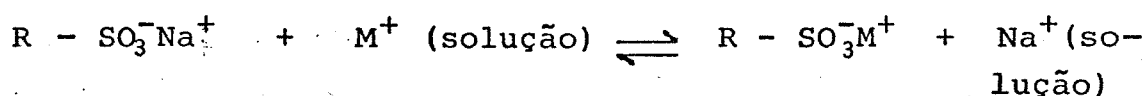
A cromatografia por troca iônica é utilizada na análise de compostos iônicos ou ionizáveis, especialmente em aplicações inorgânicas e bioquímicas. Alguns componentes bioquímicos, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, que são termicamente instáveis ou não voláteis, não podem ser separados por cromatografia gasosa; no entanto podem ser separados através de cromatografia por troca iônica, bastando para isso escolher um pH adequado para a fase móvel aquosa, onde estes compostos se encontram na forma ionizada. Além desses, outros compostos podem ser separados por este tipo de cromatografia, como por exemplo, ácidos carboxílicos e açúcares, bem como cátions e ânions inorgânicos.

Espécies hidrolíticas de Cr(III) podem ser separadas empregando-se cromatografia por troca iônica. A maioria dos métodos citados na literatura emprega este tipo de cromatografia (1-10). Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária possui grupos carregados positiva ou negativamente, os quais retêm espécies com carga contrária.

Um trocador catiônico possui grupos com carga negativa que retêm seletivamente espécies catiônicas. Neste caso, a fase estacionária tem carga negativa e possui um contra-íon de carga positiva, para preservar a neutralidade elétrica. Ocorre uma competição entre os íons da amostra e o contra-íon,

também presente na fase móvel, pelos sítios carregados da fase estacionária.

O equilíbrio iônico para trocadores catiônicos pode ser representado da seguinte maneira:



Onde: M^+ - cátion

R - matriz do trocador.

O coeficiente de distribuição (K), pode ser representado por:

$$K = \frac{[R - SO_3^- M^+] [Na^+]}{[R - SO_3^- Na^+] [M^+]}$$

sendo função de alguns parâmetros experimentais, como pH, raio iônico, porosidade das partículas que compõem a fase estacionária, força iônica, temperatura, etc.

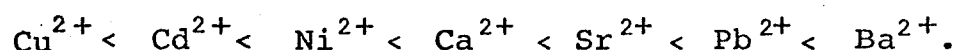
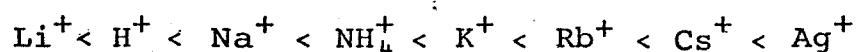
O tamanho das partículas que constituem a fase estacionária possibilita distinguir dois tipos de cromatografia por troca iônica. Na cromatografia clássica emprega-se partículas maiores que $40\mu m$, e no caso de cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, emprega-se partículas de menor diâmetro.

Na cromatografia por troca iônica clássica, os materiais mais utilizados são polímeros sintéticos orgânicos, denominados como resinas, capazes de trocar íons (11). Este material é composto de uma matriz orgânica porosa, onde encon

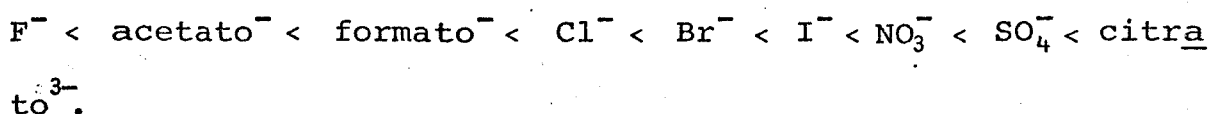
tram-se ligados grupos ionizáveis (ácidos ou básicos).

A capacidade de troca de uma resina, é definida como o números de sítios de troca da matriz (equivalentes) por peso de material. Estes valores estão tipicamente na faixa de 3-5 meq/grama de resina (12). A capacidade de resinas fortemente ácidas ou básicas é independente do pH da fase móvel, enquanto que, em resinas fracamente ácidas ou básicas o pH influencia bastante na capacidade de troca.

A seletividade depende principalmente da carga iônica e raio iônico dos íons hidratados, bem como o grau de entre cruzamento da resina. Íons divalentes são mais atraídos pela resina que íons monovalentes. Diferentes íons de mesma carga tipicamente terão afinidade inversamente proporcional a seus raios iônicos hidratados. Para cátions monovalentes e divalentes a ordem de afinidade para um trocador catiônico fortemente ácido é;



Para ânions a seletividade varia de acordo com o tipo de resina estudado. A ordem de afinidade para um trocador aniônico fortemente básico é:



O grau de entre cruzamento está relacionado com a rigidez da resina e com o tamanho dos poros; quanto maior for o grau de entre cruzamento, expresso em porcentagem de divinil

benzeno empregado na copolimerização do estireno, menor serão os poros das partículas e maior a rigidez mecânica (11). Para cátions monovalentes, quanto maior o grau de entrecruzamento maior a seletividade.

Além destes materiais baseados nos polímeros de estireno-divinilbenzeno existem outros empregados em cromatografia por troca iônica clássica, como por exemplo, celulose, dextrana, gel de acrilamida e trocadores inorgânicos.

Na CLAE os materiais mais utilizados como fase estacionária são resinas baseadas em poliestireno-divinilbenzeno, cujo diâmetro das partículas são menores ($10\mu\text{m}$), que as utilizadas por troca iônica clássica; partículas peliculares de sílica ou esferas de vidro recobertas ou ligadas superficialmente com trocadores iônicos e partículas porosas de sílica de pequeno diâmetro ($5\text{-}10\mu\text{m}$) com fase quimicamente ligada a trocadores iônicos, o que resulta em um material mais resistente a pressão.

1.2. ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III)

1.2.1. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

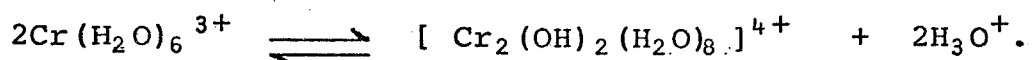
Espécies hidrolíticas de Cr(III) são obtidas a partir de refluxo de soluções aquosas de sais de ácido forte (perclorato, sulfato, nitrato, cloreto), de adição de base a estes sais, de oxidação do Cr(II) ou através da dissolução de cromatos irradiados com neutrons. Neste último caso obtêm-se espécies marcadas com ^{51}Cr .

Uma solução contendo um destes sais de Cr(III), quando refluxada, leva à formação de uma mistura de espécies poliméricas constituídas de átomos de cromo ligados por pontes "OH" e carga positiva elevada.

Foi verificado (1) que o refluxo de uma solução de perclorato de cromo provocava uma diminuição na quantidade do monômero com uma consequente formação de dímero e trímero. Após uma hora de refluxo a quantidade do dímero chegou a um máximo; enquanto que, para obter-se um máximo de espécie trimérica havia necessidade de várias horas de refluxo. A adição de hidróxido de sódio antes do refluxo favoreceu a formação de uma maior quantidade de dímero e trímero.

Thompson e Connick (8) e Finholt et al. (9) também empregaram o refluxo de soluções de perclorato e nitrato de cromo para obtenção destas espécies hidrolíticas.

O método da adição de hidróxido para preparação de misturas de espécies hidrolíticas de Cr(III) foi empregado por Stunzi (11). O método consta na adição de hidróxido de sódio a uma solução de perclorato de cromo, o que promove a polimerização. A equação abaixo mostra a formação do dímero:



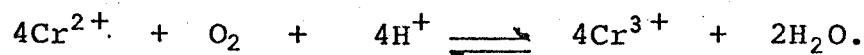
Fatores como a quantidade e forma de adição do hidróxido parecem ser importantes com respeito a quantidade relativa dos produtos formados (1,10).

Outra maneira de preparação de espécies hidrolíticas de Cr(III), levando a uma predominância da espécie diméri

ca, é através da oxidação do Cr(II) a Cr(III) por oxigênio. O Cr(II) pode ser obtido a partir de sais de Cr(III) através da redução eletrolítica (2,3,14), ou utilizando o redutor de Jones (15,16), ou ainda, através da redução de Cr(VI) empregando o mesmo redutor de Jones (17,18).

O redutor de Jones consta de zinco amalgamado com cloreto de mercúrio(II) em meio ácido (19). A finalidade de amálgama é evitar a evolução excessiva de hidrogênio. Entretanto, isto faz com que haja uma perda na capacidade redutora do zinco.

O Cr(II) obtido nos processos de redução é oxidado a Cr(III) pelo oxigênio (19) e encontra-se principalmente na forma dimérica; a percentagem desta espécie depende de diversos fatores,

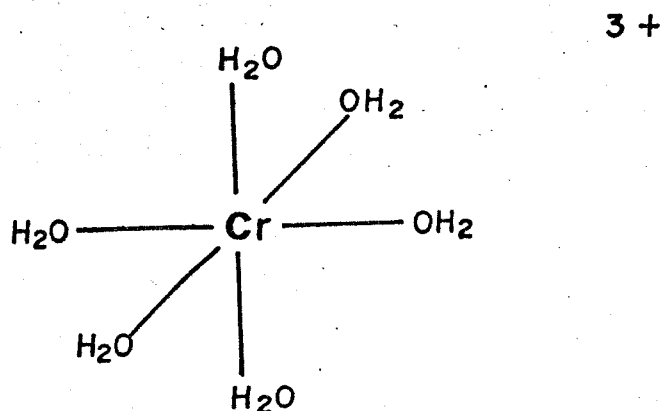


como por exemplo, a percentagem de mercúrio no amálgama, pureza do zinco, tamanho das partículas de zinco, etc.

Um outro método muito utilizado para preparação das espécies hidrolíticas de $^{51}\text{Cr(III)}$ é através da dissolução de cromatos irradiados com neutrons (5,6).

1.2.2. ESTRUTURA

O monômero possui estrutura octaédrica com 6 moléculas de água na esfera de coordenação (20,21), como está indicado no desenho abaixo.



Este íon possui um comportamento hidrolítico em solução, caracterizado por reações de polimerização cineticamente lentas, produzindo espécies poliméricas de carga elevada.

A formação do dímero foi sugerida por Hall e Eyring (22) para explicar a queda na relação Mo/Cr em soluções de nitrato de cromo refluxada por várias horas, em titulações condutométricas com paramolibdato de amônio (20). Neste trabalho a titulação foi efetuada na mistura e não nas espécies separadas. Posteriormente, Laswick e Plane (1) e Ardon e Linnenberg (3) empregaram este método para determinar a relação Mo/Cr das duas espécies separadas por cromatografia, chegando a conclusão de que as espécies hidrolíticas possuíam 2 e 3 átomos de cromo.

Estas conclusões foram confirmadas por medidas crioscópicas, adicionando monômero e dímero separadamente a um solvente puro. Assim, para uma determinada concentração de cro

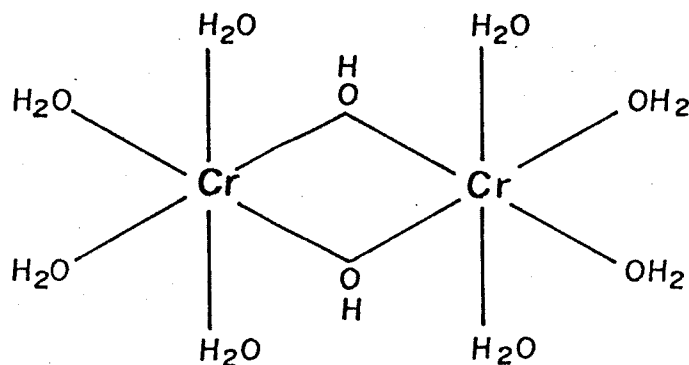
mo, o dímero provocou um abaixamento do ponto de congelamento do solvente puro igual à metade daquele provocado pelo monômero.

Thompson e Connick (8) e Ardon e Linenberg (3) determinaram o grau de polimerização para as espécies separadas por cromatografia e os dados obtidos sugeriram que a segunda espécie eluída nos métodos de separação empregados, ou a espécie produzida em maior quantidade empregando o redutor de Jones, era um dímero. A terceira espécie eluída foi proposta como sendo um trímero.

Finholt et al. (9) determinaram o número de hidróxidos por átomo de cromo, analisando a solução inicial quanto a concentração de íons H^+ livres inicialmente e de cromo por oxidação com peróxido de hidrogênio em presença de hidróxido de sódio. O conteúdo de álcali foi determinado por titulação com ácido clorídrico..

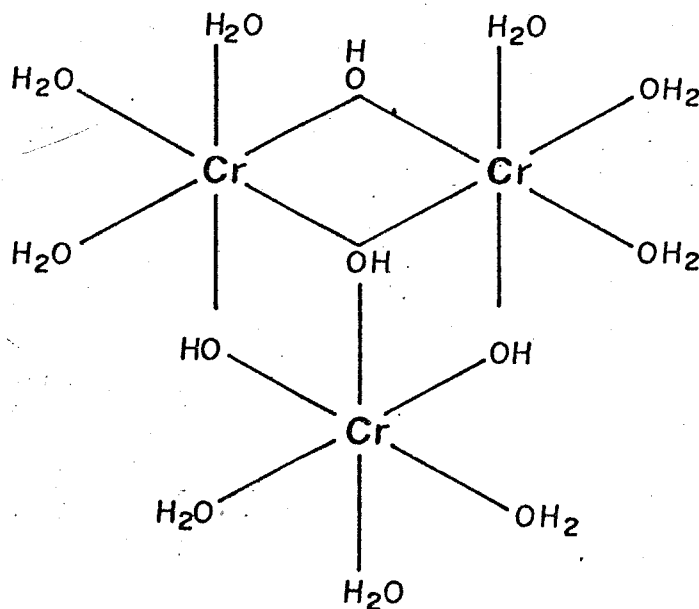
Prosseguindo os estudos, Finholt et al. (9) determinaram a carga por átomo de cromo e a carga por espécie das duas espécies separadas por cromatografia. Os resultados obtidos (carga 4+ para o dímero e 5+ para o trímero), forneceram duas estruturas possíveis para o dímero, ambas com carga final 4+. Estudos posteriores (14), empregando ¹⁸O mostraram que o dímero possui 2 pontes "OH" ligando os dois átomos de cromo, como indica a seguinte estrutura:

4 +

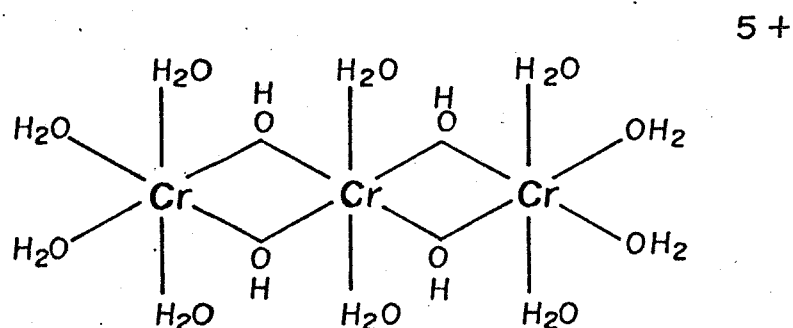


Através de medidas de suscetibilidade magnética e de ressonância paramagnética eletrônica foram propostas (8,9) duas estruturas para o trímero:

5 +



ou:

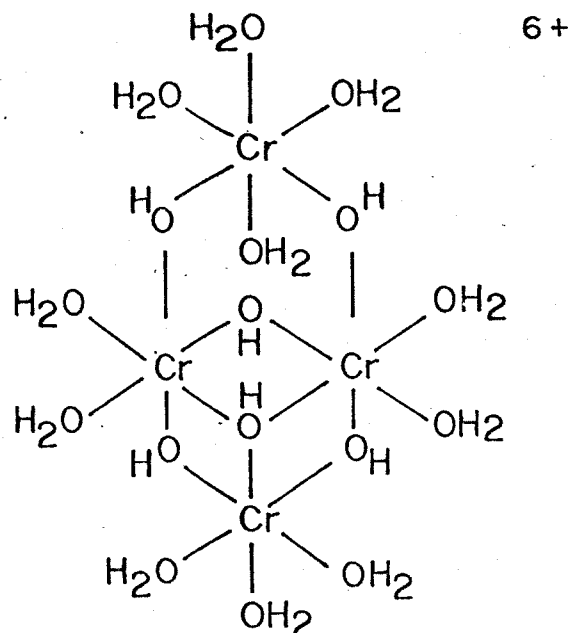


Medidas de pKa realizadas por Stunzi (13) revelaram que a primeira estrutura explica a menor acidez do trímero em relação ao dímero, como pode-se verificar na Tabela 1.1.

TABELA 1.1. Valores de pKa para as espécies hidrolíticas de Cr(III) (13).

Monômero	Dímero	Trímero	Tetrâmero
4,29	3,68	4,35	2,55
6,1	6,04	5,63	5,08
		6,0	

Para o tetrâmero, Stunzi (13) sugere a seguinte estrutura:



baseado em valores de pKa (Tabela 1.1.), estabilidade em ácido perclórico e dados sobre quebra e síntese de tetrâmero marcado com ^{51}Cr .

1.2.3. SEPARAÇÃO

A primeira separação foi obtida por Laswick e Plane (1) em soluções de perclorato de cromo submetidas a refluxo, empregando resina de troca catiônica. A espécie com um átomo de cromo (monômero) foi eluída com ácido perclórico 1 mol.L^{-1} ; perclorato de lantânio $0,02$ e $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ em pH 2 foi utilizado para a eluição de duas outras espécies denominadas de dímero e trímero. Verificaram ainda, a presença de outras espécies com maior grau de polimerização retidas pela resina, devido a coloração verde remanescente, no topo da coluna, após

o término da análise.

Ardon e Plane (2), empregando o mesmo método de análise, separaram os produtos da oxidação de soluções de Cr(II) com oxigênio, verificando que a espécie produzida por este método tinha o mesmo comportamento que a segunda espécie eluída por Laswick e Plane.

Finholt et al. (9) desenvolveram dois métodos cromatográficos para a separação de espécies obtidas de refluxo de soluções de nitrato ou perclorato de cromo, ou a partir da oxidação do Cr(II).

No primeiro método as espécies foram eluídas com perclorato de bário $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em ácido perclórico 2 mol.L^{-1} . Quando utilizou resina com partículas pequenas (denominada coloidal) verificaram a separação de 5 bandas; no entanto, o emprego de resinas com partículas maiores ($63\text{-}150\mu\text{m}$) resultou na separação de três espécies, e novamente observou a retenção de espécies poliméricas no topo da coluna.

O método de eluição em cromatografia por troca iônica tem a desvantagem de fornecer as espécies em uma solução do eluente, o que muitas vezes pode interferir nos métodos analíticos utilizados. Para evitar este problema, Finholt et al. (9) separou três espécies empregando deslocamento com perclorato de tório. Neste caso, o tório desloca as três espécies com velocidades diferentes e fica retido pela resina. No final da análise tem-se as espécies em uma solução que contém apenas íons H^+ como estranhos (no começo da análise a resina estava na forma H^+). A desvantagem deste método é que dificilmente a segunda banda é obtida pura porque estará sem

pre contaminada com a primeira ou terceira banda.

Thompson e Connick (8) também empregaram deslocamento com perclorato de tório ou eluição com perclorato de cálcio para a separação de três espécies denominadas monômero, dímero e trímero.

Collins et al. (7) e Gutlich e Harbottle (4) empregaram ácido perclórico 4 mol.L^{-1} para a eluição do monômero e ácido clorídrico 5 mol.L^{-1} para a eluição do dímero. Aqui também as espécies poliméricas ficam retidas pela resina. Este método foi extensivamente utilizado nos últimos anos em estudos de cromatos irradiados com neutrons e dopados com ^{51}Cr (5,6,23,24).

Bonato (10) desenvolveu recentemente três métodos cromatográficos para a separação de espécies de Cr(III) . O primeiro método, denominado método do nitrato de cálcio, emprega resina AG 50W x-4, partículas com diâmetro de 38-75 μm , e soluções de nitrato de cálcio e nitrato de lantânio para a separação de 5 espécies. Foi verificado, através de uma série de experimentos, que neste método o monômero, dímero e trímero eluem como 3 picos separados; o tetrâmero e pentâmero eluem juntos no quarto pico, enquanto que outros polímeros ficam retidos pela resina. Este método é simples e de baixo custo.

O segundo método utiliza cromatografia líquida de alta eficiência com colunas de 4,6 x 200 mm recheadas com Partisil 10 SCX, partículas de 10 μm , e soluções de nitrato de cálcio para eluição de 5 picos. É um método rápido e de boa resolução, no entanto, requer equipamentos e fase estacionária

de alto custo.

O terceiro método utiliza colunas de diâmetro interno reduzido (2mm) recheadas com a mesma fase estacionária empregada no segundo método. Neste caso emprega-se soluções de perclorato de cálcio ou perclorato de lantânio para a separação de 4 picos.

A literatura cita a espectroscopia de absorção no visível e radioatividade como métodos de detecção dos picos eluídos (1,4,7-10,13). A espectroscopia de absorção no visível (1,8,9,13) mostra-se inconveniente para identificação das espécies de Cr(III) pois os espectros destas espécies são muito semelhantes, como pode-se verificar na Figura 1.1. Se uma espécie estiver contaminada com pequenas proporções das outras, através do espectro ela pode ser julgada como sendo pura.

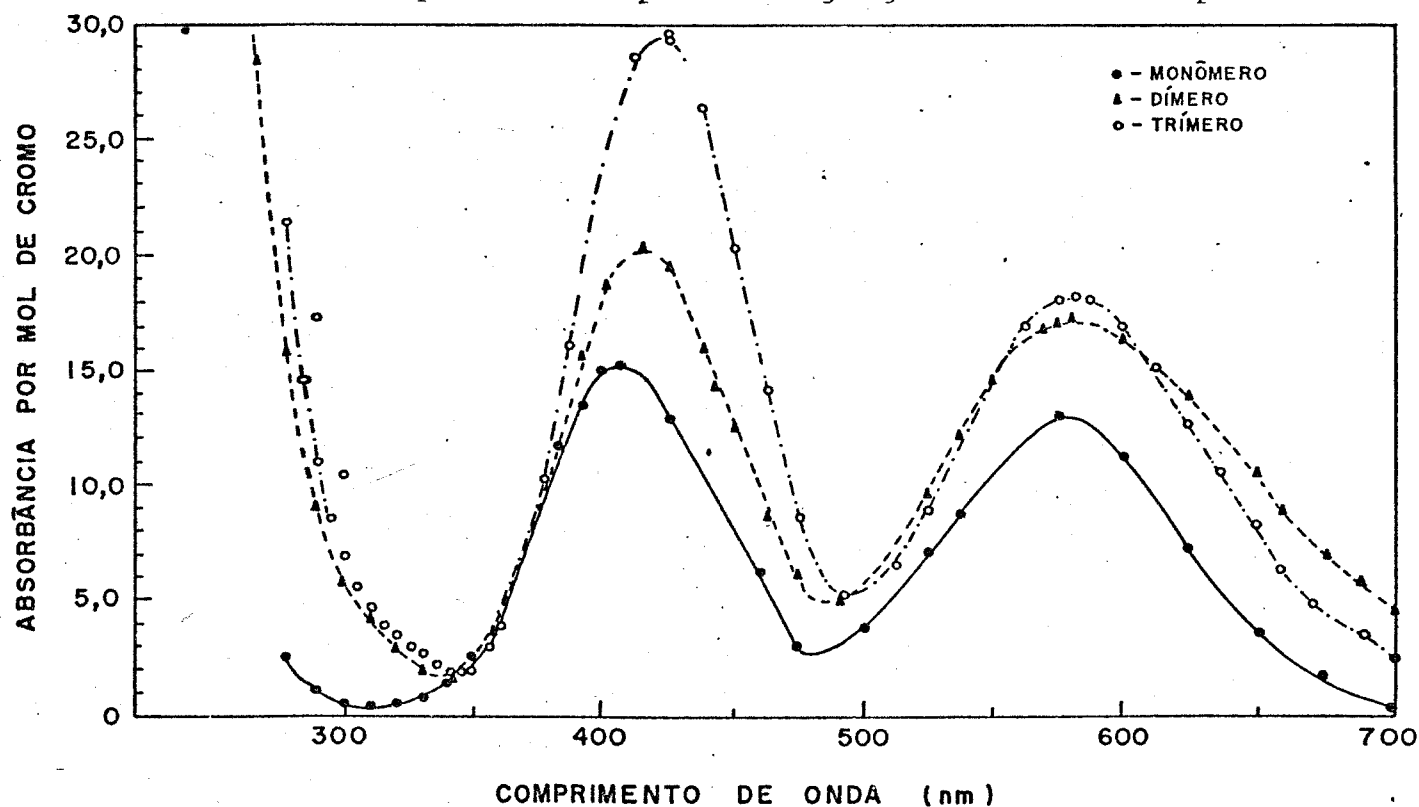


Figura 1.1. Espectro de absorção no visível das espécies hidrolíticas de Cr(III) (8).

A detecção pelo método radioanalítico também não identifica as espécies eluídas mas é um método altamente sensível sendo que a quantidade das substâncias utilizadas é, com frequência, extremamente pequena (na ordem de nanograma ou menos), porque através da radiação as substâncias radioativas podem ser detectadas em quantidades muito pequenas.

Este método de análise utiliza cromatografia de troca iônica para a separação das espécies de cromo marcadas com ^{51}Cr . As espécies eluídas são coletadas em frações, e em seguida mede-se a radioatividade presente em cada fração, bem como a atividade presente na resina, após o término da análise (4,7,10). A figura 1.2. mostra esse modo de detecção para as espécies hidrolíticas de Cr(III) por cromatografia de troca iônica (10).

O método radioanalítico de análise usando o método do nitrato de cálcio apresenta a desvantagem de consumir muito tempo, uma vez que as frações são coletadas, o que gasta aproximadamente 3 horas (ver Figura 1.2.), sem contar o tempo para a calibração do detector de NaI(Tl) e na contagem das frações coletadas.

O uso de reações químicas em cromatografia líquida, com propósitos de detecção tem aumentado muito nos últimos dez anos. Muitos trabalhos têm sido publicados a respeito desta técnica de análise (25-40). A técnica de derivatização pós-coluna foi usada com sucesso durante muitos anos em combinação com cromatografia clássica em coluna, para análise comercial de aminoácidos (35). Os aminoácidos incolores, ao efluírem da coluna cromatográfica, reagem com a ninhidrina

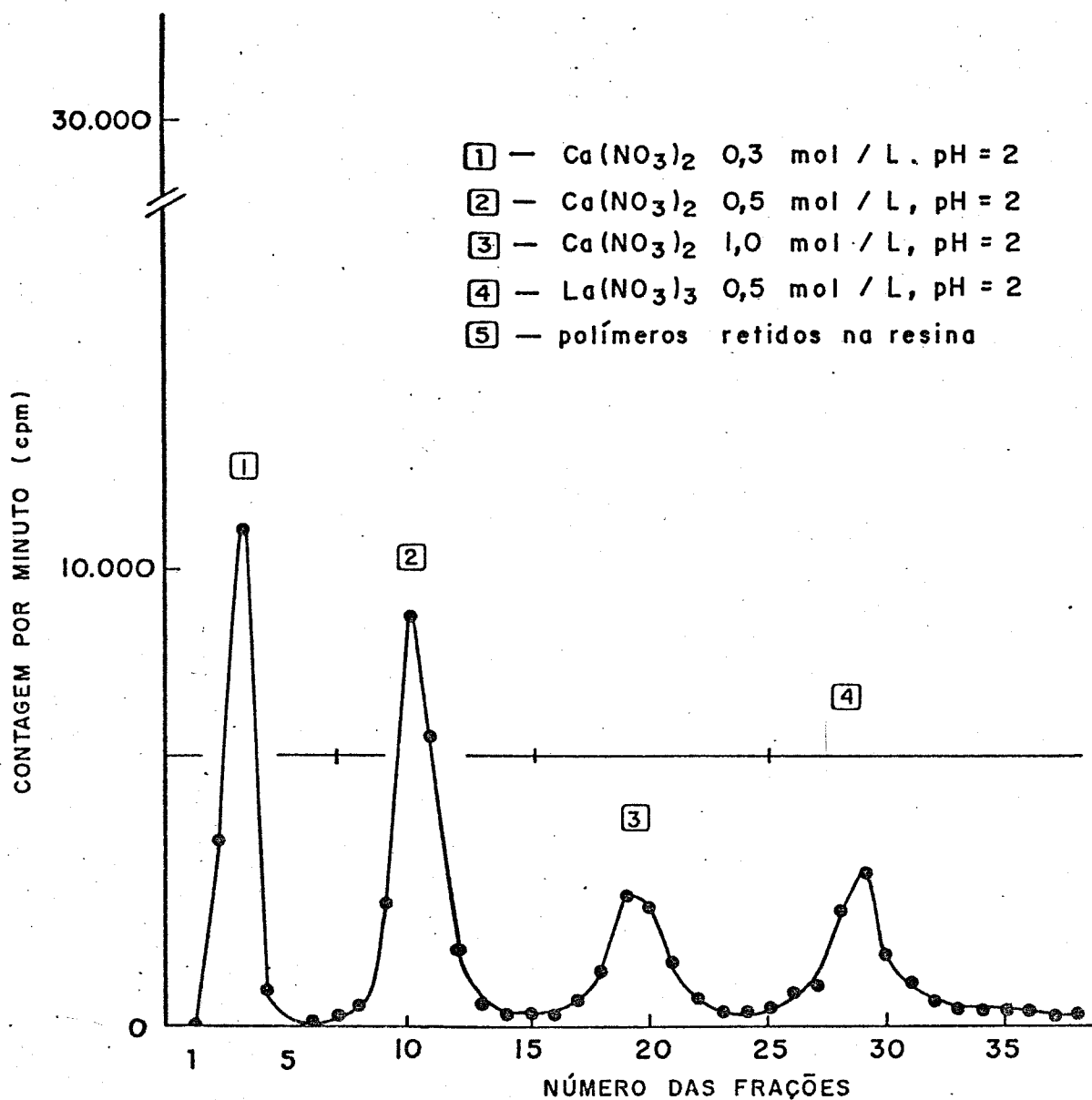


Figura 1.2. Separação de espécies de Cr(III) empregando o método do nitrato de cálcio (10).

Fase estacionária: AG 50W x-4. Volume da amostra: 50 μL ; Volume das frações coletadas: 2mL. Dimensões da coluna: 0,6 x 2cm. Vazão da fase móvel: 0,5mL/min. Detector de NaI(Tl).

para formar compostos coloridos que absorvem a 570 nm, podendo ser analisados por meio de um detector UV-visível.

Existem várias alternativas que possibilitam a realização de uma derivatização, de acordo com o objetivo que se quer alcançar, e pode ser conduzida por um grande número de procedimentos, como se encontra esquematizado na Figura 1.3.

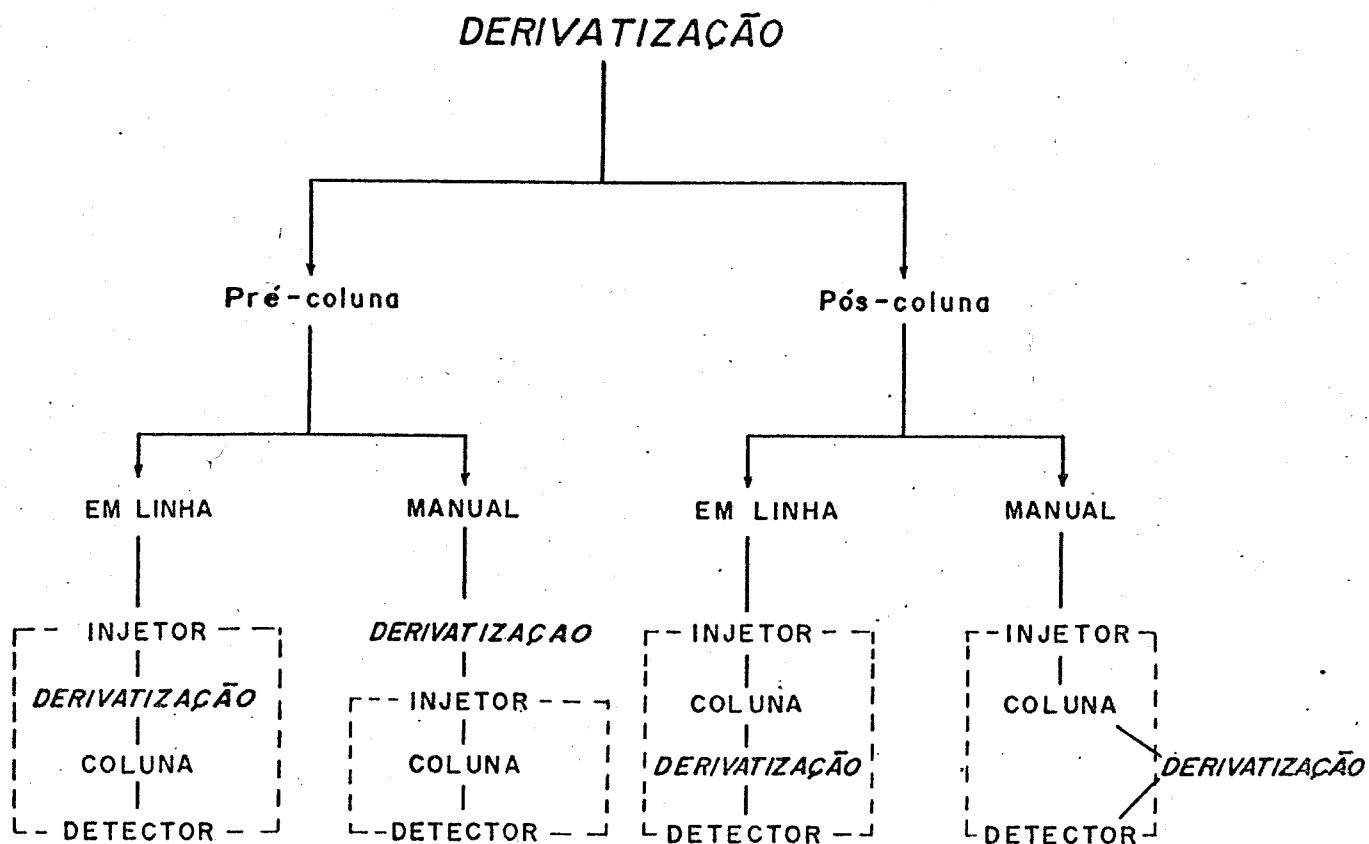


Figura 1.3. Procedimentos cromatográficos para derivatização química pré e pós-coluna.

Porém, o acoplamento de reações com propósitos de detecção às colunas de cromatografia líquida requer uma atenção cuidadosa no que se refere a seleção da reação e ao desempenho do equipamento. Isto ocorre porque podem surgir sérios efeitos extra coluna que serão discutidos posteriormente (item 1.5.), o que limita o uso de tais reações em cromatografia líquida.

No entanto, quando o problema maior para uma dada aplicação está relacionado com a sensibilidade e/ou especificidade na detecção, esta técnica mostra-se altamente potente.

1.3. OBJETIVOS

Embora a hidrólise e polimerização de íons metálicos de transição, em solução aquosa, ocorram naturalmente, as quantidades destes íons nas águas naturais é tipicamente muito pequena.

Portanto, há interesse na análise destas espécies (especiação), e para tal é necessário recorrer a procedimentos mais sensíveis para detectar quantidades pequenas destas espécies em solução.

No caso particular de espécies hidrolíticas de Cr(III) , na presença ou não de Cr(VI) , é impossível até o momento analisá-las separadamente numa amostra. O desenvolvimento de um procedimento adequado possibilitará a análise de cada espécie de Cr(III) (monômero, dímero, trímero, etc.) separadamente.

Este trabalho tem como objetivo maior desenvolver um método de detecção das espécies de Cr(III) separadas a nível de traços, espectrofotometricamente, através de uma derivatização pós-coluina, em fluxo contínuo. A formação de complexos altamente coloridos após uma separação cromatográfica, pode causar um grande aumento na sensibilidade de detecção de cada uma destas espécies.

Após a separação cromatográfica, faremos uso do reagente colorimétrico 1,5-difenilcarbazida (DFC), posterior a etapa de oxidação de cada uma das espécies de Cr(III). Este reagente reage somente com o estado de oxidação seis do metal, permitindo especiação após a separação cromatográfica.

Os métodos cromatográficos que estão sendo utilizados em nosso trabalho são os já desenvolvidos em trabalhos anteriores (10) do nosso laboratório e, em princípio poderão ser usados sem modificação.

O diagrama geral que descreve o sistema que foi desenvolvido em nossa pesquisa de laboratório se encontra esquematizado na Figura 1.4.

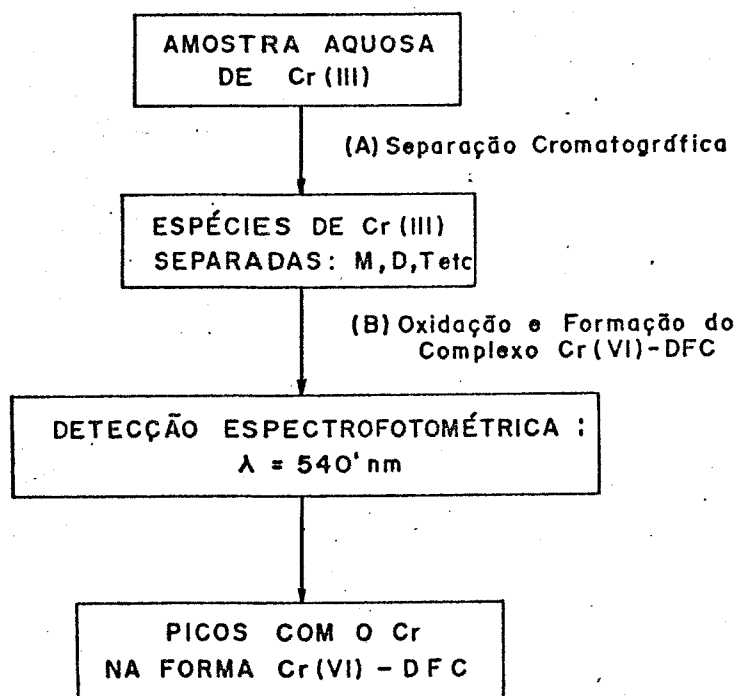


Figura 1.4. Diagrama geral de separação e derivatização das espécies de Cr(III).

1.4. DERIVATIZAÇÃO PRÉ- E PÓS-COLUNA

1.4.1. A TÉCNICA PRÉ-COLUNA

A técnica de derivatização pré-coluna, antes da separação cromatográfica, pode ser realizada manualmente antes da amostra ser introduzida no sistema cromatográfico, e/ou diretamente em linha como parte do sistema cromatográfico, como está esquematizado na Figura 1.3.

Dentre as razões nas quais algumas amostras não podem ser injetadas diretamente numa coluna de cromatografia, requerendo antes um tratamento adicional, podemos citar as seguintes:

- A amostra deve ser constituída de uma solução homogênea em um solvente não mais forte que a fase móvel usada para efetuar a separação. Amostras contendo sólidos ou materiais particulados, duas fases líquidas e amostras dissolvidas em solventes fortes usualmente dão pobre separação e, em alguns casos, pode até causar danos a coluna (12).

- Para possibilitar uma sensibilidade adequada como por exemplo, a análise de traços, que sempre requer uma pré-concentração da amostra.

- Amostras muito complexas contendo vários componentes que podem ocasionar danos a coluna.

Outras amostras podem ainda apresentar problemas em termos de sensibilidade do detector. Por exemplo, a absortividade de compostos - chave na amostra pode ser muito baixa

para que possa ser medida com um detector fotométrico, ou então os compostos de interesse podem estar sobrepostos no cromatograma final pela interferência dos vários compostos contidos na amostra.

Neste tipo de derivatização pré-coluna, a amostra, antes de ser injetada, primeiramente reage com um reagente apropriado produzindo compostos derivatizados de interesse que, quando selecionados, poderão dar uma boa resposta no detector, com relação a outros componentes da amostra. A amostra assim derivatizada pode então ser injetada para separação final por cromatografia líquida ou gasosa.

1.4.2. A TÉCNICA PÓS-COLUNA

Tal como a técnica pré-coluna, a derivatização pós-coluna pode ser realizada em linha, onde os reagentes são misturados ao efluente em fluxo contínuo ou segmentado por bolhas de gás, ou manualmente, coletando-se o efluente em frações. A técnica de derivatização pós-coluna é geralmente utilizada quando a amostra de interesse possui propriedades pobres de detecção. Além de melhorar as propriedades de detecção, a reação química efetuada pode também aumentar a seletividade do método analítico total.

Um esquema geral de um sistema CLAE acoplado com detector de reação pós-coluna em linha é dado na Figura 1.5. A bomba B1 é usada para impulsionar o(s) eluente(s). Logo após os compostos serem separados pela coluna analítica, CA, o(s) reagente(s) pós-coluna são adicionados com a bomba B2 através de uma conveniente mistura. Finalmente, o fluxo combinado é

passado através de um reator apropriado até alcançar o detector.

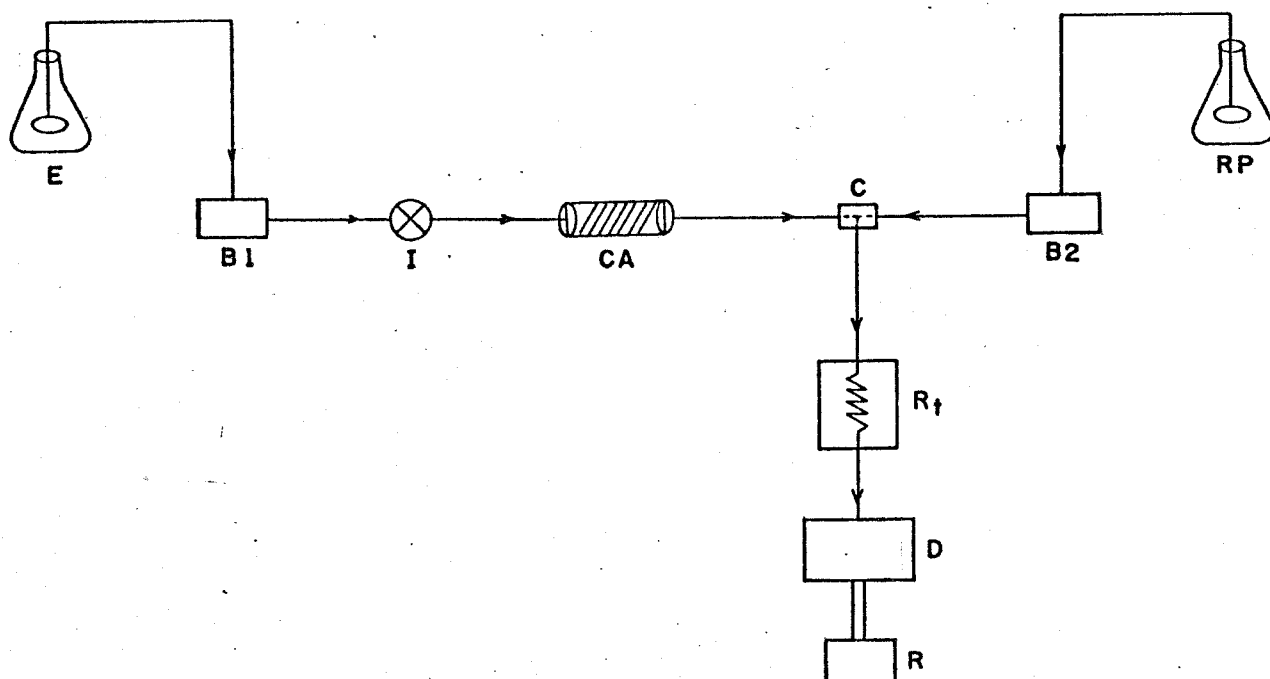


Figura 1.5. Esquema de um sistema CLAE acoplado com reator pós-coluna.

E - eluente. B1 - bomba 1. CA - coluna analítica.
C - conector. B2 - bomba 2. RP - reagente pós-coluna
 R_t - reator pós-coluna. D - Detector. R - registra -
dor. I - injetor ...

Várias são as vantagens de se utilizar a derivatização pós-coluna. É negligenciável a formação de sub-produtos nos reatores pós-coluna; a reação não necessita ser completa e totalmente definida, além do mais, os produtos da reação não precisam ser estáveis e, por último diferentes princípios de detecção podem ser usados em série. O único requisito exigido é quanto a reprodutibilidade da reação.

As desvantagens são a possibilidade se surgirem problemas de mistura do(s) reagente(s) pós-coluna com o efluente devido ao bombeamento imperfeito; o compromisso entre o(s) solvente(s) usado(s) para efetuar a separação e o meio da reação; sérias perdas da resolução cromatográfica causada pelo alargamento da banda no reator e a interferência de excesso de reagentes no sinal dos produtos da reação.

Existem formas de reduzir as desvantagens acima mencionadas pelo uso de diferentes tipos de reatores, específicos para cada reação particular. Eles serão discutidos no item 1.5.

1.4.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS DUAS TÉCNICAS

A tabela 1.2. (41) apresenta uma comparação mais detalhada das duas técnicas de derivatização pré- e pós-coluna.

1.5. TIPOS DE REATORES PÓS-COLUNA

A escolha de um reator para uma reação particular depende principalmente da cinética da reação. Em princípio, três diferentes tipos de reatores podem ser distinguidos, ou seja, os reatores tubulares abertos (retos, espiralados ou entrelaçados) (RTA), os reatores recheados homogêneos (RRHo) e heterogêneos (RRHe) e os reatores tubulares para fluxo segmentado (RTFS).

O alargamento da banda causado pelo reator depende principalmente das condições de fluxo no reator e pode ser deduzido para os dois primeiros tipos de reatores mencionados

TABELA 1.2. Comparação de derivatização pré- e pós-coluna (41)

	PÓS-COLUNA	PRÉ-COLUNA
Preparação da amostra	Simplex	Mais complexa
Limitação do reagente	O reagente não deve absorver luz de λ da medida	O reagente não deve interferir com a separação dos produtos
Velocidade da reação	A reação precisa ser rápida	Reações lentas podem ser usadas
Estabilidade do produto	Produtos estáveis e instáveis podem ser detectados	Produtos da reação devem ser estáveis
Separação	Fácil	Pode ser difícil
Habilidade de automação	Fácil	Muito difícil
Capital de custo	Moderado	Baixo
Custo de mão-de-obra	Baixo	Alto

acima, através do uso de equações relativamente simples.

1.5.1. REATORES TUBULARES ABERTOS (RTA)

São construídos de aço inox ou tubos de politetrafluoroetileno (Teflon). O espiralamento ou entrelaçamento tem um efeito positivo no decréscimo do alargamento da banda. Baseando-se em princípios clássicos de fluxo dinâmico, é possível prever a dependência do alargamento da banda em unidades de tempo (δ_t) sobre os vários parâmetros de fluxo e geometria. A equação 1.1. (30), descreve esta dependência.

$$\delta_t = \left(\frac{K \times t_v \times d_t^2}{96 D_m} \right)^{0.5} \quad (\text{equação 1.1.})$$

onde: K = constante cujos valores se situam no intervalo ($0 < K \leq 1$), e cujo valor para tubos abertos é 1.

t_v = tempo médio de residência no reator (s).

d_t = diâmetro interno do tubo (cm).

D_m = coeficiente de difusão da amostra no fluido reacional (cm^2/s).

Desta equação, podemos concluir que o uso de tubos de diâmetro interno reduzido provocará um menor alargamento da banda, o que, por outro lado produzirá uma queda de pressão (ΔP), dada pela equação 1.2, de Poissuille (30).

$$\Delta P = \frac{512 \eta \times F^2 \times t_v}{\pi^2 \times d_t^6} \quad (\text{equação 1.2.})$$

onde: η = viscosidade do fluido que atravessa o reator (P)

F = velocidade total de fluxo volumétrico no reator (mL/s)

ΔP = queda de pressão (atm)

1.5.2. REATORES RECHEADOS HOMOGÊNEOS (RRHo) E HETEROGÊNEOS (RRHe)

Os reatores recheados homogêneos (RRHo) são construídos de colunas de vidro ou de aço inox e recheados com partículas pequenas de vidro, inertes e não porosas. O alargamento da banda em unidades de tempo (δ_t) é dado pela equação 1.3. (30).

$$\delta_t = \left(\frac{t_v \times h \times d_p}{L} \right)^{0.5} \quad (\text{equação 1.3.})$$

onde: h = altura reduzida do número de pratos teóricos cujos valores estão situados entre 2 e 6 e dependem da qualidade do recheio.

d_p = diâmetro médio das partículas (μm).

L = comprimento do reator (cm).

Dessa equação fica evidenciado que o alargamento da banda é reduzido utilizando-se partículas pequenas e/ou aumentando o comprimento do reator, para um tempo de residência constante. A queda de pressão (ΔP) sobre o reator está relacionada com os mesmos parâmetros mencionados na equação 1.3., sendo dada pela equação 1.4. (30).

$$\Delta P = \frac{\eta \times L^2}{K_o \times t_v \times d_p^2} \quad (\text{equação 1.4.})$$

onde: K_o = constante de permeabilidade cujo valor está situado entre 0,001 e 0,002.

η = viscosidade do fluido que atravessa o reator (P).

Este tipo de reator é indicado tanto para tempos de reação intermediários (cerca de 0,5 - 4,0 minutos), como para reações lentas usando sistemas de fluxo segmentado (item 1.5.3.).

Os reatores recheados heterogêneos (RRHe) também são construídos de colunas de vidro ou de aço inox, recheados com materiais que participam na reação, tal como um suporte quimicamente carregado no qual o recarregamento é sempre efetuado após o esgotamento, ou um material catalítico que possa ser usado sobre um longo período de tempo.

O uso destes reatores têm algumas vantagens sobre os homogêneos no caso do reagente ser somente útil na forma sólida, quando é muito caro (reações enzimáticas) e, também, para simplificar o sistema de detecção.

Trabalhos anteriores no campo de reatores de fase sólida heterogêneos envolvem a detecção de tióis e dissulfetos nos quais os compostos de interesse liberta um cromóforo do material de recheio da coluna do reator e a absorbância do cromóforo é lida (42). Alguns exemplos de materiais catalíticos são trocadores iônicos, superfícies de metal carregado e enzimas imobilizadas.

Recentemente, Ruter et al. (27,43) desenvolveram um reator de fase sólida de dióxido de chumbo para oxidação de Cr(III), eluídas da coluna analítica, à cromato.

1.5.3. REATORES TUBULARES PARA FLUXO SEGMENTADO (RTFS)

É indicado para reações lentas (até 20 minutos); para reações de duas fases ou de extração. Foi introduzido por Skeegs (44) e tem sido extensivamente usado em autoanalisadores. É baseado na segmentação de um fluxo líquido com bolhas de ar introduzidas dentro do sistema a certos intervalos de tempo. O objetivo da segmentação é na redução da difusão axial da zona da amostra e consequente minimização do alargamento da banda.

Algumas tentativas têm sido feitas para descrever um sistema de reação através da segmentação de ar. A variância da distribuição do tempo de residência pode ser descrita como dada pela equação 1.5. (45,46).

$$\Delta \delta_{td}^2 = \frac{2\pi^2 \times d \times L \times r^3}{Q^2} \quad (\text{equação 1.5.})$$

onde: d = espessura da camada líquida sobre a parede do tubo (cm).

L = comprimento do tubo (cm).

r = raio do tubo (cm).

l = comprimento de um segmento do líquido (cm).

Q = velocidade de fluxo volumétrica (mL/s).

Esta equação 1.5. mostra que valores pequenos $\Delta \delta_{td}^2$ podem ser obtidos usando pequenos segmentos de líquido, obtidos por meio de uma alta frequência de bolhas de ar. O uso de tubos curtos, alta velocidade de fluxo e tubos de diâmetro

interno reduzido são também recomendados.

Snyder (47,48) propôs uma descrição mais teórica para o fenômeno da dispersão em fluxo segmentado, em que a variância em unidades de tempo para um fluxo segmentado, através de tubos abertos, é dada pela equação 1.6.

$$\Delta\sigma^2_{tr} = \left(\frac{0,2 d_t^{2/3} (\phi + nV_g)^{5/3} \eta^{2/3}}{T^{2/3} \times D_r \times \phi} \right) + \frac{1}{n} \times \left(\frac{2,35 (\phi + nV_g)^{2/3} \eta^{2/3} \times t_v}{\eta^{2/3} \times \phi \times d_t^{4/3}} \right) \quad (\text{equação 1.6.})$$

onde: d_t = diâmetro interno do tubo do reator (cm).

ϕ = vazão do líquido através do reator (mL/s).

n = frequência de segmentação (s^{-1}).

V_g = volume de uma bolha de gás (mL).

η = viscosidade da mistura de reação (P).

T = tensão superficiais da mistura (dyna/cm).

D_r = coeficiente de difusão de traços de substâncias em água (cm^2/s).

Experimentalmente, os termos mais importantes são d_t , ϕ e n . No entanto, as influências de η , δ , D_r e tempo de reação precisam ser considerados. Em situações com alta tensão superficial, surfactantes são comumente usados. Outros fatores tais como conexões, espiralamento dos tubos de reação e segmentação imediata do efluente da coluna têm influência pronunciada sobre o alargamento da banda.

Deelder e Hendricks (45), afirmam que a maior porção do alargamento total da banda é determinada pela peça em "T", onde os fluxos se misturam, e pelo separador de fase ou debulhador, necessário para produzir um fluxo homogêneo através do detector, do que pelo próprio reator pós-coluna.

1.5.4. APLICAÇÕES DE REATORES PÓS-COLUNA

A tabela 1.3. (30) menciona alguns exemplos de aplicações típicas utilizando os diversos tipos de reatores descritos anteriormente bem como os modos de detecção, já utilizados para CLAE.

TABELA 1.3. Alguns exemplos de reatores pós-coluna usados em CLAE (30).

COMPOSTOS	REAGENTES	REATOR	DETECÇÃO
Aminoácidos	o-ftaldeído	RTA	F
		RR	F
Carbamatos	NaOH, o-ftaldeídos	RTA	F
Hidroxiperóxidos	NaI	RR	UV
Compostos Organo-sulfúricos	Pd(II)-calceína	RTFS	F

onde: F = fluorescente

UV = ultravioleta

Uma grande variedade de íons metálicos têm sido enriquecidos e determinados a nível de traços utilizando CLAE acoplada a reatores pós-coluna. Cassidy e Elchuk (39) determina

ram Mn(II), Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Pb(II) e lantanídeos (III) a nível de pg/mL, efetuando primeiro uma separação destes íons sobre um trocador de íons fortemente ácido de fase ligada (5 e 10 μ m), e de fase normal (17 μ m), utilizando um reator de aço inox de volume morto desprezível para misturar o efluente com os reagentes pós-coluna, vermelho de alizarina, PAR e arsenazo I.

A eficiência da separação destes íons foi testada separadamente utilizando-se trocadores iônicos de fase ligada e de fase normal. Trocadores iônicos de fase ligada mostraram algumas vantagens sobre resinas convencionais, no entanto é necessário o uso de fases ligadas de alta capacidade. Para separação de íons metálicos, resinas convencionais de estireno-divinilbenzeno são quase tão eficientes quanto trocadores de fase ligada, a temperatura ambiente.

Fritz e Story (38) utilizaram CLAE para separação de vários íons metálicos sobre resinas macroreticulares de troca iônica de baixa capacidade. Depois de separados, os íons metálicos eluídos da coluna foram determinados pela adição em linha de reagentes derivatizantes pós-coluna através de uma mistura em "T" de volume morto desprezível.

Ruter et al. (27) utilizaram recentemente um sistema semelhante para determinação de Cr(III) e Cr(VI) a nível de ng/mL. As espécies de Cr(III) eluídas da coluna analítica foram oxidadas à cromato através de um reator de fase sólida de dióxido de chumbo (43), e então detectadas espectrofotometricamente com a 1,5-difenilcarbazida, a 540 nm. O método de separação utiliza CLAE de troca iônica com coluna de 4,6

x 250mm recheada com Spherisorb ODS II, partículas de 5µm, e soluções tampões de acetato de sódio (pH 4,0), de concentrações variadas para a eluição das espécies de Cr(III). O limite de detecção para o Cr(VI) foi de 0,1µg/mL e para o Cr(III) de 0,1µg/mL, usando um volume da amostra de 100 µL. O artigo é pouco claro a respeito de como as espécies hidrolíticas de Cr(III) são oxidadas simultaneamente no reator de dióxido de chumbo, como também não faz referência aos cromatogramas das espécies de Cr(III) separadas.

C A P Í T U L O 2

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAIS

2.1.1. REAGENTES

Todas as soluções utilizadas com os reagentes mencionados abaixo foram preparadas com água deionizada, lavando-se previamente todos os materiais de vidro com solução alcóólica de hidróxido de sódio, água destilada e então deionizada.

REAGENTES (PA)	FABRICANTE
Acetona	Grupo Química
Ácido perclórico	Malinckrodt
Ácido sulfúrico	Merck
Biftalato de potássio	Reagen
Dicromato de potássio	The G. Frederick Smith Chemical Co.
Dicromato de sódio	Baker Analyzed
1,5-difenilcarbazida	The G. Frederick Smith Chemical Co.
Hidróxido de sódio	Ecibra Reagentes
Iodeto de potássio	Merck
Óxido de cálcio	Carlo Erba

REAGENTES	FABRICANTE
Peróxido de hidrogênio	Baker Analyzed
Sulfato Cérico	Carlo Erba
Tetraborato de sódio	Fisher Scientific Compa ny

2.1.2. SOLUÇÃO DE Cr(VI) 1000µg/mL

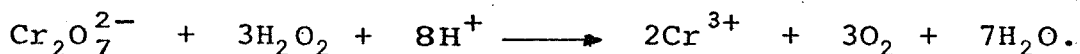
Foram preparadas soluções padrão estoque de 1000µg/mL de Cr(VI) em ácido perclórico 0,10M. Esta solução foi preparada com $K_2Cr_2O_7$ (100% de pureza), considerada como padrão primário (49). Para tal dissolveu-se 2,8290g de $K_2Cr_2O_7$ (seco por 2 horas a 150°C) em béquer de 100mL, adicionou-se 8,59mL de ácido perclórico concentrado e, após a transferência quantitativa para um balão volumétrico de um litro, completou-se o volume com água.

2.1.3. SOLUÇÃO DE Cr(III) 1000µg/mL

A solução padrão estoque de Cr(III) foi obtida por redução de 500mL da solução de dicromato de potássio contendo 1000µg/mL de Cr(VI) em $HClO_4$ 0,10M, com peróxido de hidrogênio 30% (v/v) em presença de ácido perclórico (50). A redução foi realizada adicionando-se 3,31mL de ácido perclórico à 500mL de solução de Cr(VI) e 2,92mL (duas vezes o necessário) de peróxido de hidrogênio, com resfriamento da solução em banho de gelo para minimizar a polimerização do Cr(III).

A solução obtida após a redução apresentou pH aproximadamente igual a 1 e coloração violeta, correspondente à es-

pécie monomérica $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. No processo de redução de Cr(VI) a Cr(III) ocorre a formação de oxigênio, como indicado na reação (19):



O oxigênio, bem como o excesso de peróxido de hidrogênio, foram eliminados borbulhando-se nitrogênio durante 12 horas, sob agitação constante. A seguir, esta solução foi deixada em contato com negro de platina, que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio, por 4 horas, sob agitação, e posteriormente, filtrada em membranas de polissulfona com poros de $10\mu\text{m}$, para eliminação das partículas de platina.

2.1.4. MISTURA DE ESPÉCIES DE Cr(III)

Amostras contendo uma mistura de espécies de Cr(III) foram preparadas a partir de uma solução de perclorato de cromo $0,1 \text{ mol/L}$, pH 1, a qual foi obtida a partir de dicromato de potássio por redução com peróxido de hidrogênio, em presença de ácido perclórico, utilizando-se o mesmo procedimento anteriormente mencionado.

Foi empregado o método da adição de hidróxido (13) para preparação da mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III). O método consta na adição de hidróxido de sódio a uma solução de perclorato de cromo, o que promove a polimerização. A quantidade e a forma de adição do hidróxido têm influência com respeito a quantidade de produtos formados (1, 10).

Adicionamos a uma alíquota da solução de perclorato de cromo 0,1 mol/L, hidróxido de sódio 3 mol/L até pH 4. Op-tamos por esta versão do método que produz uma mistura mais homogênea das espécies de interesse (10).

2.1.5. REAGENTES PÓS-COLUNA

Os reagentes pós-coluna e as concentrações mais adequados utilizados no nosso trabalho para a oxidação e comple-xação em linha das espécies hidrolíticas de Cr(III) eluídas da coluna cromatográfica foram obtidas com base em trabalhos anteriores (51-53), que determinaram sequencialmente Cr(VI) e Cr(III) (monômero), usando a técnica de Injeção em Fluxo Con-tínuo (IFC) baseados na reação do Cr(VI) com a 1,5-difenilcar-bazida, DFC, em meio ácido.

Os reagentes pós-coluna utilizados foram:

a) Sulfato Cérico

Vários são os agentes oxidantes que podem ser usados para a oxidação do Cr(III). Os procedimentos usualmente ado-tados envolvem a oxidação do Cr(III) a Cr(VI) com permangana-to (54,55) ou com persulfato, usando AgNO_3 como catalisador (54,56,57). Como o permanganato absorve próximo ao $\lambda_{\text{máx}}$ do complexo Cr-DFC, ele não pode ser usado em nosso procedimento pós-coluna em linha. Resultados obtidos com uma solução de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), com AgNO_3 como catalisador (52), mostraram resultados não reprodutíveis em linha, embora a reação seja de cinética relativamente rápida. Sob as mes-mas condições experimentais, o Ce(IV) mostrou-se mais conveni

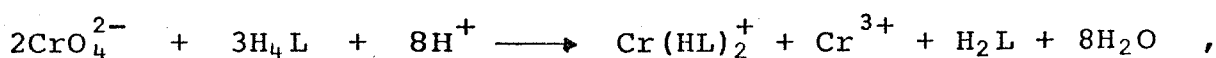
ente sob condições dinâmicas (52).

Neste trabalho, as soluções de Ce(IV) foram preparadas a partir de solução estoque de Ce(IV) 0,25% (m/v) em H_2SO_4 0,20 mol/L, estável por várias semanas (15). Uma alíquota dessa solução estoque foi diluída na proporção de 1/10 (v/v), adicionando-se ácido sulfúrico suficiente para obter uma concentração analítica final de 0,07 mol/L. Este procedimento previne a hidrólise do Ce(IV).

b) 1,5-difenilcarbazida (DFC)

Um grande número de trabalhos utilizam espectroscopia de emissão e absorção atômica como procedimentos analíticos para especiação de íons cromo (58-63). Trabalhos mais recentes (64-66) utilizam métodos e/ou aparelhagens menos sofisticados, baseados na alta sensibilidade e seletividade da 1,5-difenilcarbazida como procedimento espectrofotométrico para a determinação colorimétrica de traços de cromo (51-55).

O mecanismo da reação Cr(VI) - DFC e a composição do produto resultante, de forte coloração púrpura tem sido objeto de pesquisa nos últimos anos (67). Trabalhos relativamente recentes têm revelado que a espécie colorida é um quelato do Cr(III) (formado pela redução do Cr(VI) pela difenilcarbazida e difenilcarbazona). Esta reação pode ser descrita como:



onde $\text{Cr}(\text{HL})_2^+$ é o quelato, H_2L é a difenilcarbazona e H_4L é a difenilcarbazida (68).

A reação entre Cr(VI) e a DFC é dependente do pH (55). O procedimento estático convencional (54,55) usa H_2SO_4 entre 0,05 e 0,10M, o que proporciona um meio adequado para o completo desenvolvimento da cor do complexo Cr(VI) - DFC. De acordo com a literatura (55), em concentrações de ácido menores que 0,05M a cor não se desenvolve imediatamente e, para concentrações de ácido acima de 0,10M, o complexo é instável.

Estudos da reação Cr(VI) - DFC em linha mostraram que a sensibilidade do método varia com o ácido e sua concentração, nas mesmas condições experimentais. A sensibilidade diminui muito quando se usa baixas concentrações de ácido com a DFC, sendo este fato mais pronunciado para o HCl (51).

Embora o procedimento convencional (54,55) utilize H_2SO_4 e o procedimento em linha (IFC) (51-53) HNO_3 0,80M utilizamos em nosso trabalho $HClO_4$ 0,80M porque as soluções do eluente tem um íon comum com este ácido, e preveniríamos indesejáveis reações de precipitação com o íon cálcio que fosse eluído da coluna cromatográfica, por efeito de saturação da resina, caso utilizássemos o H_2SO_4 .

Como ambos os métodos, o estático convencional (54, 55) e o de injeção em fluxo contínuo (IFC) (51-53), utilizam concentrações de DFC a 0,05% (m/v), resolvemos usar esta concentração de DFC para as nossas condições de trabalho.

Devido a pouca solubilidade em água, a DFC foi inicialmente dissolvida em 25mL de acetona e então transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 250mL, completando-se o volume com água. Por ser sensível à luz, a solução de DFC era sempre mantida em frasco escuro envolto em pa-

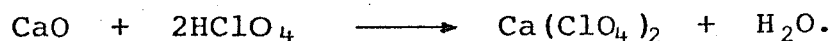
pel alumínio (55).

Todos os reagentes pós-coluna utilizados foram filtrados previamente com filtro Acrodisc de 0,45 μ m de tamanho de poros, da Gelman Science, já que a cela de absorção utilizada no detector possuía orifícios de entrada de diâmetro interno reduzido (0,23mm), onde qualquer impureza sólida poderia obstruir o caminho da solução.

2.1.6. FASES MÓVEIS

Utilizamos soluções de perclorato de cálcio 0,3; 0,5 e 1,0mol/L a pH 2,0 para a separação das espécies hidrolíticas de Cr(III) monômero, dímero e trímero, respectivamente, baseando-se em trabalhos anteriores (10) realizados em nosso laboratório. Nele desenvolveu-se um novo método para a separação das várias espécies de Cr(III) marcadas com ⁵¹Cr, denominado "método do nitrato de cálcio". Este método emprega resina AG 50W x-4, com partículas de diâmetro de 38-75 μ m, e soluções de nitrato de cálcio em várias concentrações a pH 2,0 para eluição do monômero, dímero e trímero, bem como nitrato de lantânio para eluição do tetrâmero e pentâmero.

Neste trabalho, as soluções do eluente perclorato de cálcio foram obtidas a partir do óxido de cálcio (96% pureza) e ácido perclórico concentrado (70%), estequiometricamente a partir da reação:



O pH das soluções foram ajustados com o pHmetro da Metrohm, modelo E-512, calibrado inicialmente com soluções

tampão de tetraborato de sódio (pH 9,18) e biftalato de potássio (pH 4,02). Após o ajuste do pH das soluções foi feita uma transferência quantitativa para balões volumétricos de 1000mL e, em seguida, as soluções foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos para eliminação de gases. As soluções foram filtradas utilizando-se filtro Millipore com tamanho de poros de 10µm.

2.1.7. A RESINA AG 50W x-4

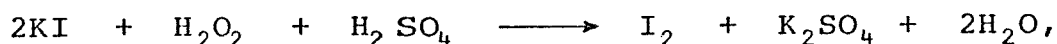
Utilizamos como fase estacionária para a separação das espécies hidrolíticas de Cr(III) (monômero, dímero e trímero), a resina de troca catiônica da Bio Rad AG 50W x-4 (<400 mesh). Esta resina é um trocador de cátions fortemente ácido, formado por grupos de troca de ácido sulfônico ($\text{OSO}_3^- \text{H}^+$) ligados ao polímero estireno-divinilbenzeno.

Antes de ser utilizada na preparação da coluna, esta resina foi submetida a um pré tratamento químico, para se eliminar as possíveis impurezas (agentes redutores) presentes, de acordo com o seguinte procedimento (10):

- 100g de resina foram lavadas 3 vezes com 200mL de água deionizada;
- Adição de 200mL de NaOH 0,1M e 20mL de peróxido de hidrogênio 1% em NaOH 0,1M;
- Lavagens com porções de 200mL de água deionizada até pH neutro, para eliminação de peróxido de hidrogênio e base;

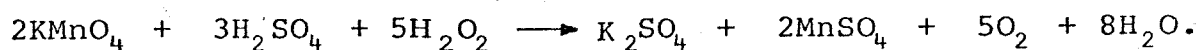
- Adição de 10mL de dicromato de sódio 0,2M e 200mL de HClO_4 0,1M. Frações de 200mL de HClO_4 0,1M foram adicionados até toda a coloração amarela de dicromato de sódio desaparecer;
- Novas lavagens com 200mL de água deionizada até pH neutro.

Após o tratamento, testou-se a presença de H_2O_2 , recolhendo-se uma fração da fase líquida sobrenadante, sobre a qual adicionou-se algumas gotas de H_2SO_4 e uma pequena quantidade de iodeto de potássio, de acordo com a reação abaixo (69):



repetiu-se o procedimento até não se detectar H_2O_2 com iodeto.

Um outro teste qualitativo foi realizado com solução de permanganato em solução ácida de acordo com a reação (69):



Para se evitar reações colaterais indesejáveis durante a separação das espécies de cromo, como por exemplo, traços de H_2O_2 absorvidos na resina que podem provocar a redução do Cr(VI) durante a eluição da amostra, submeteu-se a resina a um outro tratamento, na coluna, antes de se injetar a amostra. Este tratamento foi feito eluindo-se 0,5mL de dicromato de sódio 0,2M, 5mL de HClO_4 0,05M e água deionizada suficiente para toda a coloração amarela do dicromato desaparecer.

Após a eluição das espécies foram realizadas lavagens alternadas da resina, na coluna, com 10mL de HClO_4 4M, necessários para regenerar a coluna. Por último, a resina foi lavada com água deionizada para retirar o HClO_4 4M. A seguir foram feitos testes qualitativos quanto a saturação da resina referentes aos íons cálcio da fase móvel, coletando-se frações eluídas da coluna com sulfato e fosfato, os quais foram repetidos até não ocorrer mais precipitação com os íons cálcio.

2.2. COLUNA

A coluna utilizada (Figura 2.1.) tem dimensão de 50 x 4mm é construída de Kel-F, um derivado de substituição do politetrafluoroetileno (Teflon), inerte aos solventes utilizados para efetuar a separação das espécies de Cr(III). Contém em ambas as extremidades internas um disco de polietileno poroso. A dimensão da coluna foi escolhida com o intuito de se efetuar separações mais rápidas com menos consumo de eluentes e fase estacionária.

O material da qual a coluna é construída possibilita visualizar os vazios que podem ocorrer depois do enchimento ou após algum tempo de uso. Esta coluna foi recheada com a resina AG 50W x-4 (<400 mesh) previamente tratada conforme item 2.1.7., sob pressão manual, para se evitar a quebra das partículas.

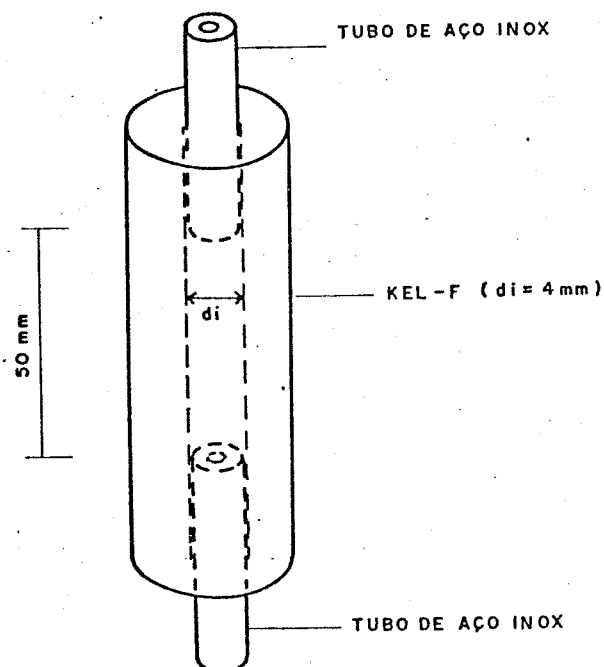


Figura 2.1. - Coluna de Kel-F.

2.3. INSTRUMENTOS

2.3.1. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

A figura 2.2., esquematiza o sistema cromatográfico que foi utilizado em nosso trabalho. O sistema consta de 3 reservatórios de solventes, A, B e C, interligados a um selector contendo uma válvula que seleciona o(s) solvente(s) a serem empregados na separação das espécies hidrolíticas de Cr(III).

A bomba responsável pela manutenção da vazão da fase móvel é da Milton Roy Company, modelo 396/2396, designada para produzir fluxo líquido em quantidades precisas contra pres

sões elevadas. O injetor utilizado é da Rheodyne, modelo 7125, de aço inox, o qual se encontra conectado à bomba e a coluna através das posições 2 e 3 respectivamente (Figura 2.2). A amostra é introduzida no injetor sob pressão manual por meio de uma seringa de vidro de 1,0mL, nas posições 1 e 4 onde se encontra uma alça (loop) de aço inox de volume de 50 μ L.

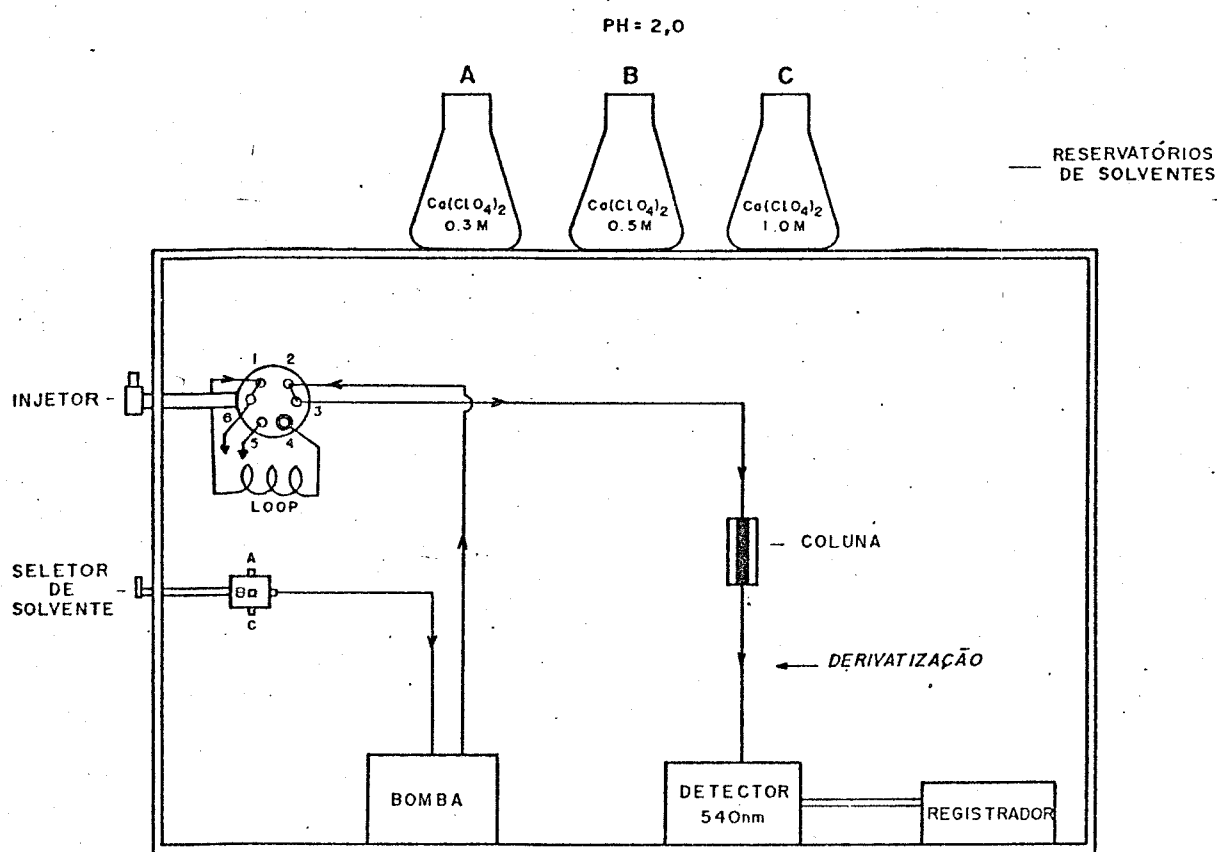


Figura 2.2. - Esquema da Separação Cromatográfica das Espécies de Cr(III) com Derivatização Pós-coluna.

A injeção da amostra na coluna ocorre por rotação da válvula, onde a fase móvel passa agora a percorrer as posições 1-2, atravessa a alça (loop), forçando a amostra para o

ácido) por meio de um injetor tipo proporcional modificado (70,71).

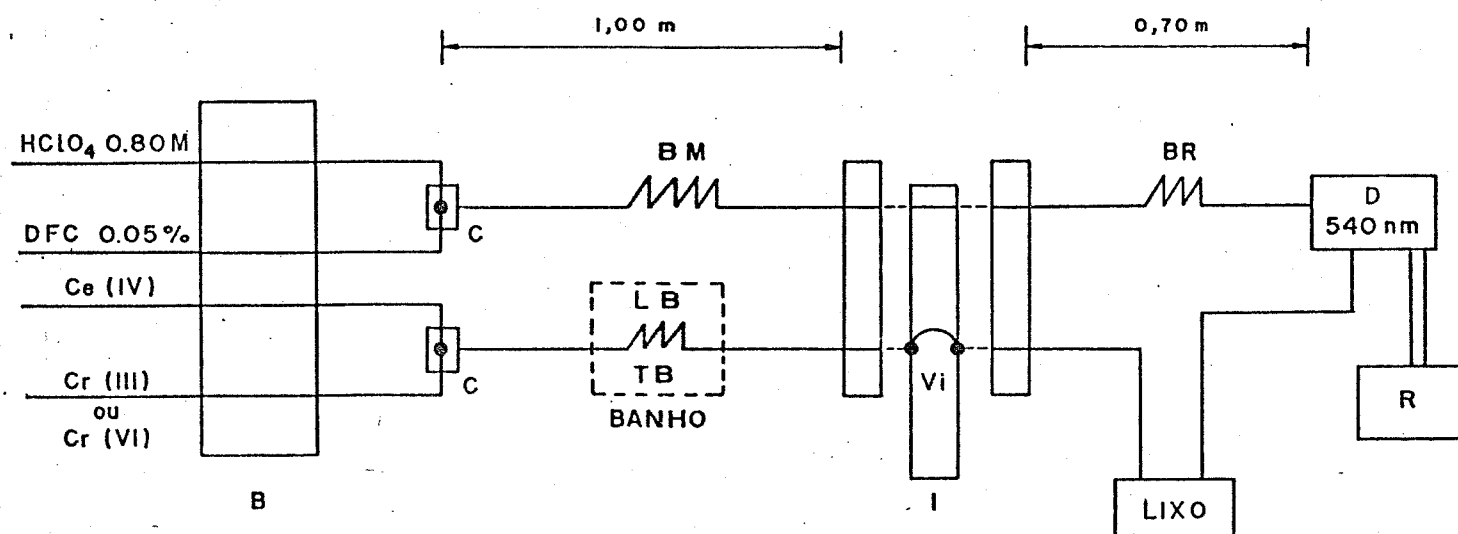


Figura 2.3. - Sistema de Injeção em fluxo contínuo utilizado para determinação de Cr(VI) e Cr(III) em linha (51-53).

Onde: B - bomba peristáltica; C - conector de acrílico;
 BM - bobina de mistura; LB - bobina de oxidação;
 TB - temperatura do banho ($^{\circ}\text{C}$); Vi - volume injetado;
 I - injetor; BR - bobina de reação;
 D - espectrofotômetro; R - registrador.

2.3.3. SISTEMA PÓS-COLUNA

Considerando-se trabalhos anteriores (51-53, 61, 62), montou-se um sistema pós-coluna para determinação de Cr(VI) com a 1,5-difenilcarbazida, conforme Figura 2.4. O sistema

consta de uma bomba peristáltica da Milan para bombeamento dos reagentes, utilizando-se tubos de Tygon marca Technicon (preto - preto). Os reagentes e o efluente confluem a 180° em conectores de acrílico (70) e aço inox. Como linhas de transmissão e bobinas de mistura e de reagentes foram utilizados tubos de polietileno e Teflon de 0,8mm e 0,3mm de diâmetro interno respectivamente.

O diâmetro interno médio dos tubos foi determinado com base na massa de água a 25°C contida nos tubos de Teflon de 5,0 metros de comprimento, e de polietileno de 4,0 metros.

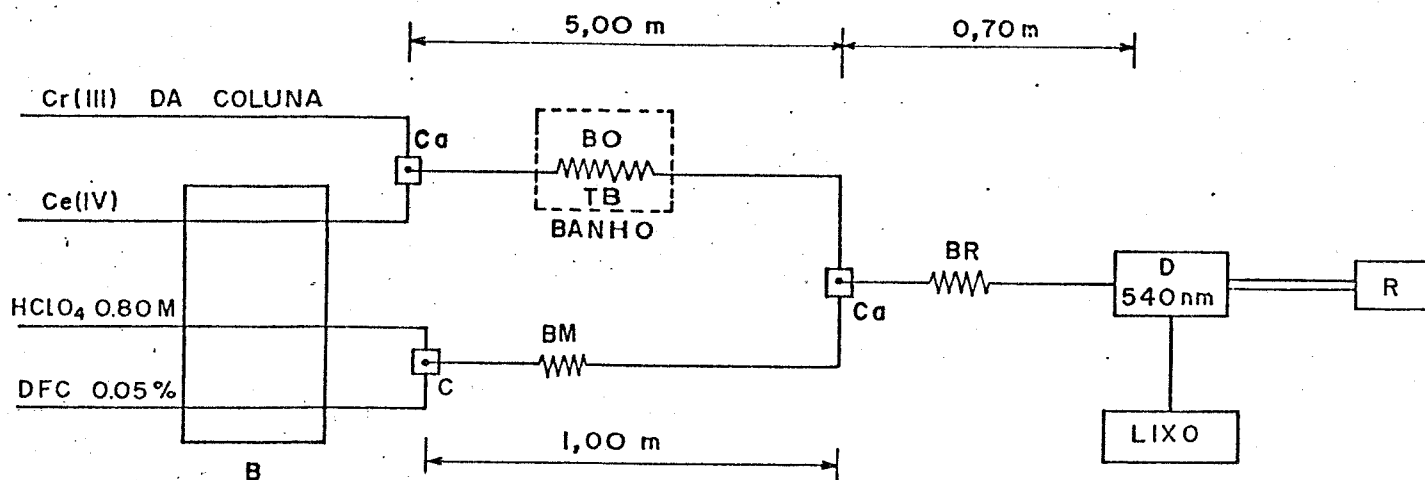


Figura 2.4. - Sistema pós-coluna utilizado para determinação de Cr(VI) com a 1,5-difenilcarbazida.

Onde: B - bomba peristáltica; BO - bobina onde ocorre a oxidação; TB - temperatura do banho ($^{\circ}\text{C}$); C - conector de acrílico; C_a - conector de aço inox; BM - bobina de mistura; BR - bobina de reação; D - detector; R - registrador.

2.3.4. DETECTORES ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Os testes preliminares do método de injeção em fluxo contínuo (IFC) (51-53), Figura 2.3., e da separação cromatográfica das espécies de Cr(III), foram realizados com o detector da Micronal, modelo B34211, com uma cela de fluxo de acrílico construída em nossas oficinas. Foi feita uma modificação da mesma quanto ao caminho ótico (Figura 2.5.), o qual foi revestido com um tubo de aço inox de 2,5mm de diâmetro interno. A intenção é eliminar pelo menos parcialmente, as inúmeras bolhas que poderiam surgir durante as análises e que prejudicam o andamento do trabalho.

Devido a problemas de ajuste ótico do aparelho Micronal, após a troca da lâmpada de tungstênio, este foi substituído nos trabalhos seguintes por um espectrofotômetro Schoeffel, modelo 770, com volume da cela de $8\mu\text{L}$, ou um espectrofotômetro Waters, modelo 481, com volume da cela de $1\mu\text{L}$.

Para a detecção direta das espécies de Cr(III) o comprimento de onda usado foi 415 nm enquanto que a detecção do complexo Cr - DFC foi efetuada a 540 nm.

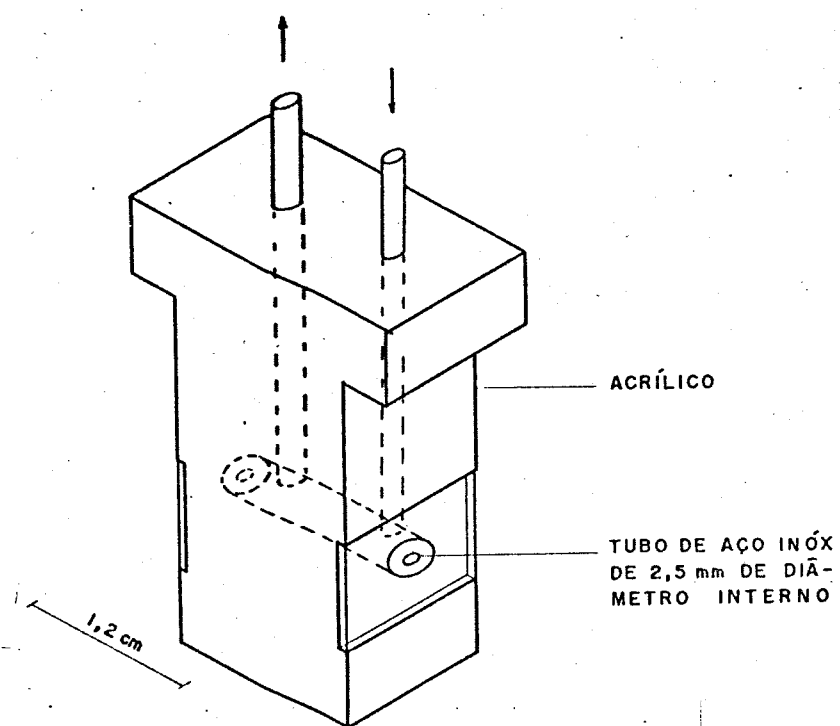


Figura 2.5. - Célula de fluxo de acrílico modificada.

C A P Í T U L O 3

3. RESULTADOS

3.1. SEPARAÇÃO DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) COM DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA A 415 nm.

O espectro de absorção das espécies hidrolíticas de Cr(III) está relacionado com transições d-d no metal, que são proibidas pelas regras de mecânica quântica (72), e portanto, os valores de absortividade molar, ϵ , são baixos. A Tabela 3.1. dá os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ para as espécies hidrolíticas de Cr(III) em solução aquosa, relatados por Stunzi e Marti (13). Dessa Tabela, parece que um comprimento de onda de 415 nm permite detectar a presença de todas as espécies hidrolíticas de Cr(III).

Sendo assim, tentamos empregar a espectroscopia por absorção no visível a 415nm para indentificar diretamente as espécies separadas. Para tal foram injetados na coluna (Figura 2.1. pág. 52), contendo a resina de troca catiônica AG 50W x-4, 50 μ L de uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III), utilizando perclorato de cálcio como eluente.

O cromatograma da Figura 3.1. ilustra que a identificação das espécies é bastante difícil, sendo somente a espê-

cie monomérica facilmente visualizada, devido a sua alta concentração neste sistema, onde existem íons estranhos da fase móvel interferindo nos métodos de análise. Assim ficou comprovado que é difícil detectar estas espécies hidrolíticas de Cr(III) utilizando espectroscopia de absorção em 415nm como método de detecção.

TABELA 3.1. Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e ξ para as espécies hidrolíticas de Cr(III) (13).

ESPÉCIE	$\lambda_{\text{máx}}$	ξ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ por íon de Cr)
Monômero	575	13,2
	408	15,5
Dímero	582	17,4
	417	20,4
Trímero	584	19,2
	425	30,5
Tetrâmero	580	15,6
	426	30,3
Hexâmero	585	18,6
	426	29,0



Figura 3.1. - Detecção de espécies hidrolíticas de Cr(III) a 415nm.

Fase estacionária: AG 50W x-4, (<400 mesh);

Fase móvel: $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,3M, 0,5M e 1,0M em pH 2;

Vazão da fase móvel: 0,5mL/min; Dimensão da coluna:

50 x 4mm; Volume da amostra: 50 μ L. Detector: Espectrofotômetro Schoeffel, cela de 8 μ L.

3.2. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(VI) POR REAÇÃO COM A 1,5-DIFENILCARBAZIDA COM INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (IFC).

Considerando-se trabalhos anteriores (51-53) e com o intuito de estabelecer as melhores condições para a reação de Cr(VI) com a 1,5-difenilcarbazida (DFC) usando ácido perclórico para manter a acidez, em vez de ácido sulfúrico (54, 55), para evitar problemas com a eventual presença de íons Ca^{2+} , já discutido anteriormente (2.1.5.) montou-se um sistema de reação em fluxo contínuo (Figura 2.3.).

As soluções de Cr(VI) foram preparadas a partir da solução estoque de $1000\mu\text{g/mL}$ e $50\mu\text{L}$ foram injetados em confluência com as soluções de HClO_4 $0,80\text{M}$ e DFC $0,05\%$. Com detecção a 540nm usando o detector espectrofotométrico Micronal (com cela de $58,9\mu\text{L}$, Figura 2.5) foram obtidos os sinais registrados na Figura 3.2. A Figura 3.3. indica a curva de calibração obtida para Cr(VI) em função da média das alturas (h) dos picos.

3.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(III) POR OXIDAÇÃO COM Ce(IV) E REAÇÃO COM 1,5-DIFENILCARBAZIDA, EM SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (IFC).

Ao sistema descrito na secção anterior, adicionou-se a linha contendo $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ $0,025\%$ (m/v) para efetuar a oxidação de Cr(III) a Cr(VI). A reação de oxidação se processa em um reator tubular aberto, BO, denominado bobina de oxidação, construído de $5,0$ metros de politetrafluoroetileno de formato espiralado com diâmetro interno de $0,3\text{mm}$, o que acarretará

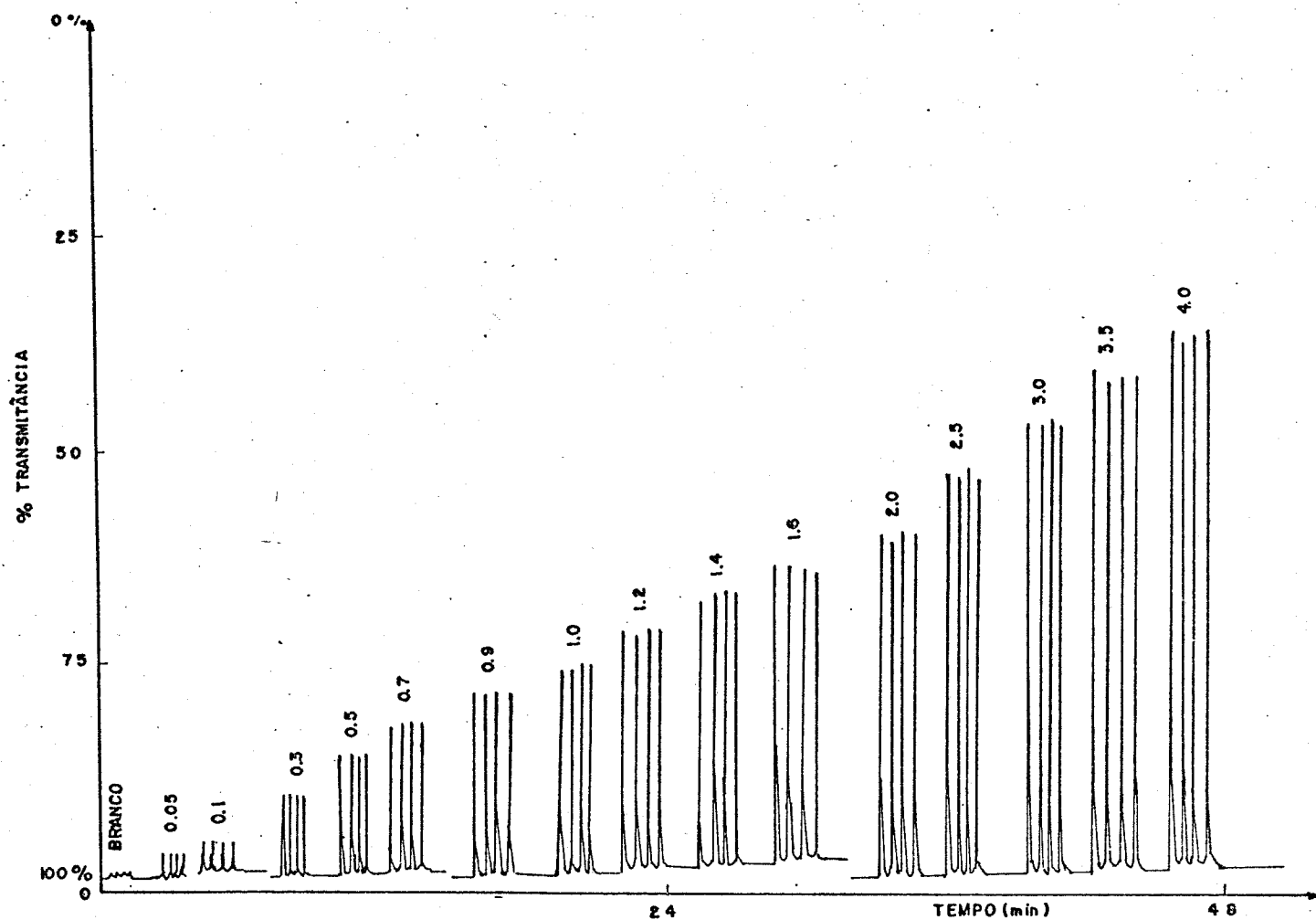


Figura 3.2. - Sinais IFC típicos, de determinações de Cr(VI) com DFC, injetando-se cada amostra em replicata. O sistema de IFC encontra-se descrito na Figura 2.3.

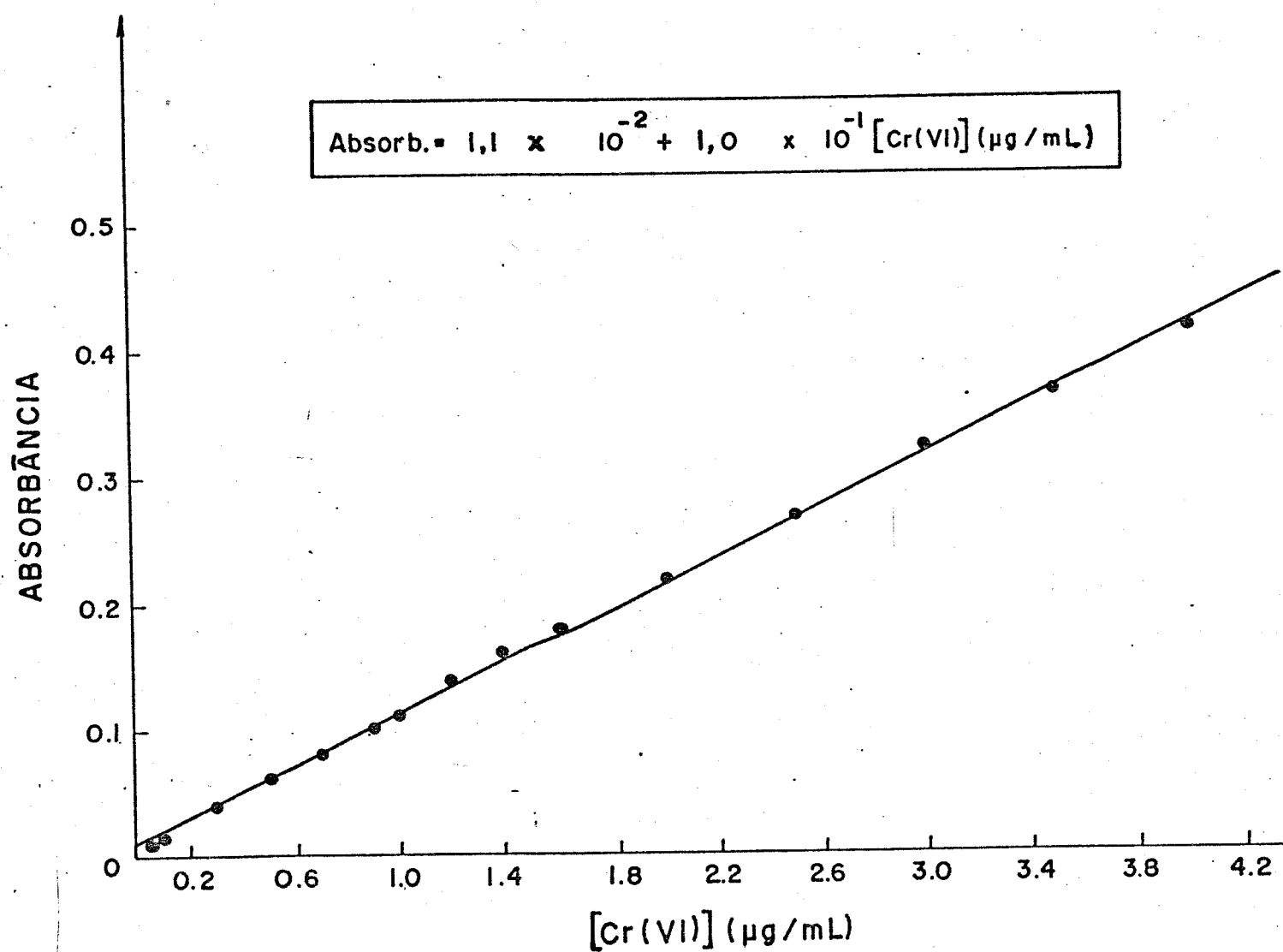


Figura 3.3. - Curva padrão de Cr(VI) utilizando o sistema IFC descrito na Figura 2.3.

num menor alargamento da banda, entretanto, induzindo uma maior queda de pressão, como é indicado pela equação 1.2. (pág. 31).

As soluções de Cr(III) foram preparadas a partir da solução estoque de 1000µg/mL. As injeções de cada solução foram realizadas 4 vezes, obtendo os sinais mostrados na Figura 3.4, dando como resultado a curva de calibração mostrada na Figura 3.5.

3.4. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO Cr(III), MONOMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.

Considerando-se trabalhos anteriores (10, 51-53) montou-se um sistema cromatográfico com reação pós-coluna em linha em fluxo contínuo, denominado derivatização pós-coluna em linha, para a determinação espectrofotométrica de Cr(III) a partir de sua oxidação a Cr(VI) com Ce(IV) para reagir com a 1,5-difenilcarbazida (DFC), conforme Figura 2.2.

O acoplamento da coluna cromatográfica com o sistema de reação pós-coluna (Figura 2.4) foi realizado utilizando-se um tubo de PTFE. As espécies de Cr(III) eluídas encontram o reagente pós-coluna, Ce(IV), por meio de um conector de aço inox e a reação se processa na bobina de oxidação, à 45°C. Após oxidação o Cr(VI) reage com a DFC. O complexo resultante é detectado em 540nm.

Os reagentes pós-coluna foram bombeados por meio de uma bomba peristáltica da Milan, usando-se tubos de bombeamento de Tygon, marca Technicon. Nas condições de trabalho a velocidade de fluxo de reagentes pós-coluna, amostra e solven-

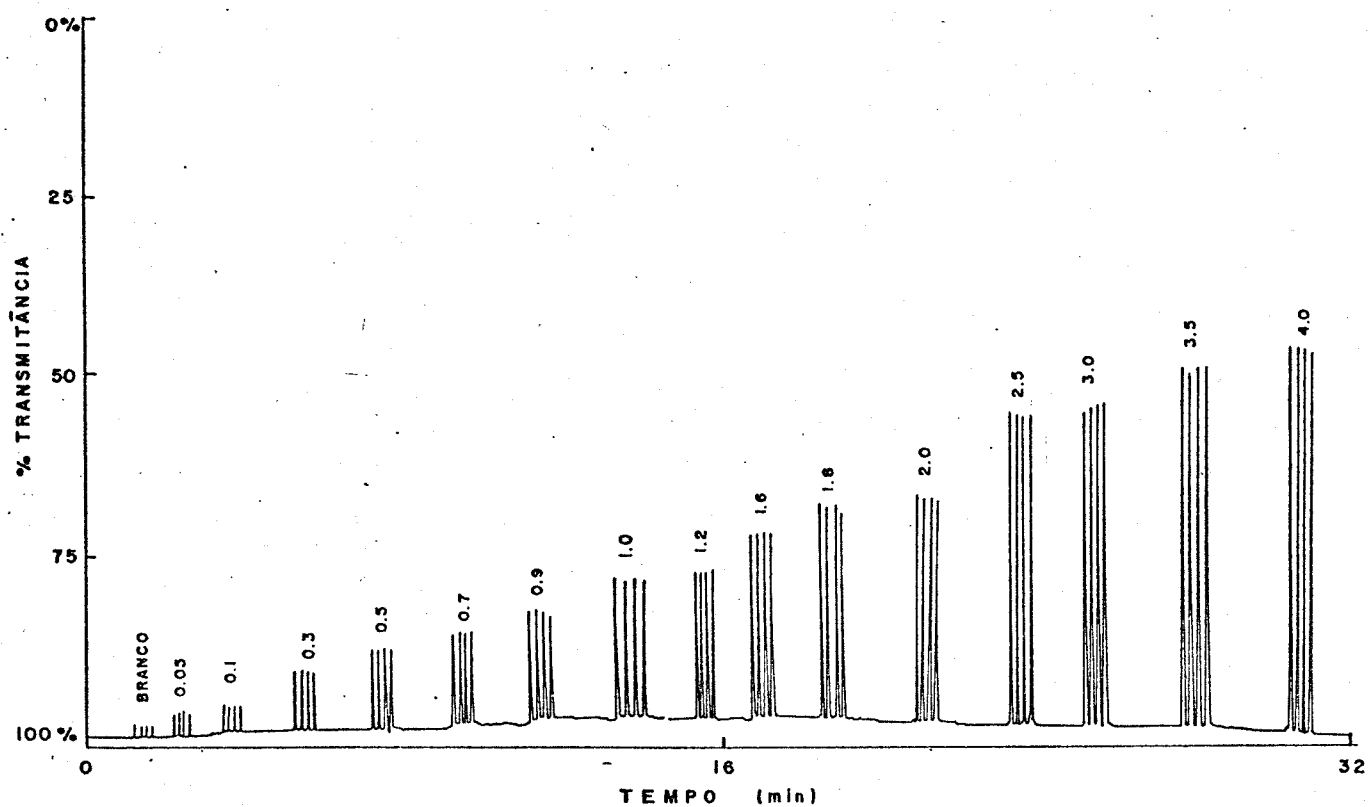


Figura 3.4. - Sinais IFC típicos, de determinações de Cr(III) com DFC, injetando-se cada amostra em replicata. O sistema de IFC encontra-se descrito na Figura 2.3.

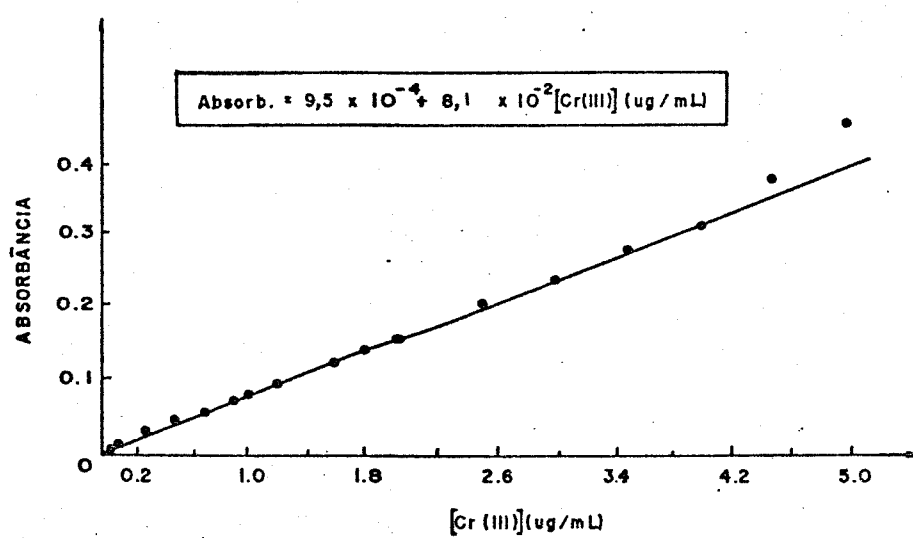


Figura 3.5. - Curva padrão de Cr(III) utilizando o sistema IFC descrito na Figura 2.3.

tes foi de 0,5mL/min.

Uma curva padrão para o Cr(III) monômero foi obtida usando-se este sistema cromatográfico pós-coluna com as seguintes condições de trabalho para a reação pós-coluna:

- Volume de solução de Cr(III) injetado de 50 μ L;
- HClO₄ 0,80M em confluência com a solução de DFC 0,05% (m/V);
- Ce(SO₄)₂ 0,025% (m/V) em H₂SO₄ 0,07M;
- Velocidade de fluxo de 0,5mL/min;
- Temperatura de 45°C para oxidação de Cr(III) em linha;
- Ca(ClO₄)₂ 0,3M como eluente.

Amostras de Cr(III) preparadas por diluição da solução estoque 0,1mol/L foram injetadas na coluna cromatográfica, iniciando as determinações pelas amostras mais diluídas. A Figura 3.6 ilustra os cromatogramas obtidos por reação pós-coluna em linha de várias amostras de Cr(III). A detecção foi realizada a 540nm com o espectrofotômetro Waters, modelo 481. A sensibilidade em unidades de absorbância (U.A.) foi variada de acordo com a concentração da amostra como se encontra indicado na Figura 3.6, e posteriormente usada para corrigir as áreas obtidas.

A conversão do sinal do detector em dados numéricos foi realizada através da medida da área do pico, pelo método da triangulação:

$$\text{Área} = \frac{B \times H}{2}$$

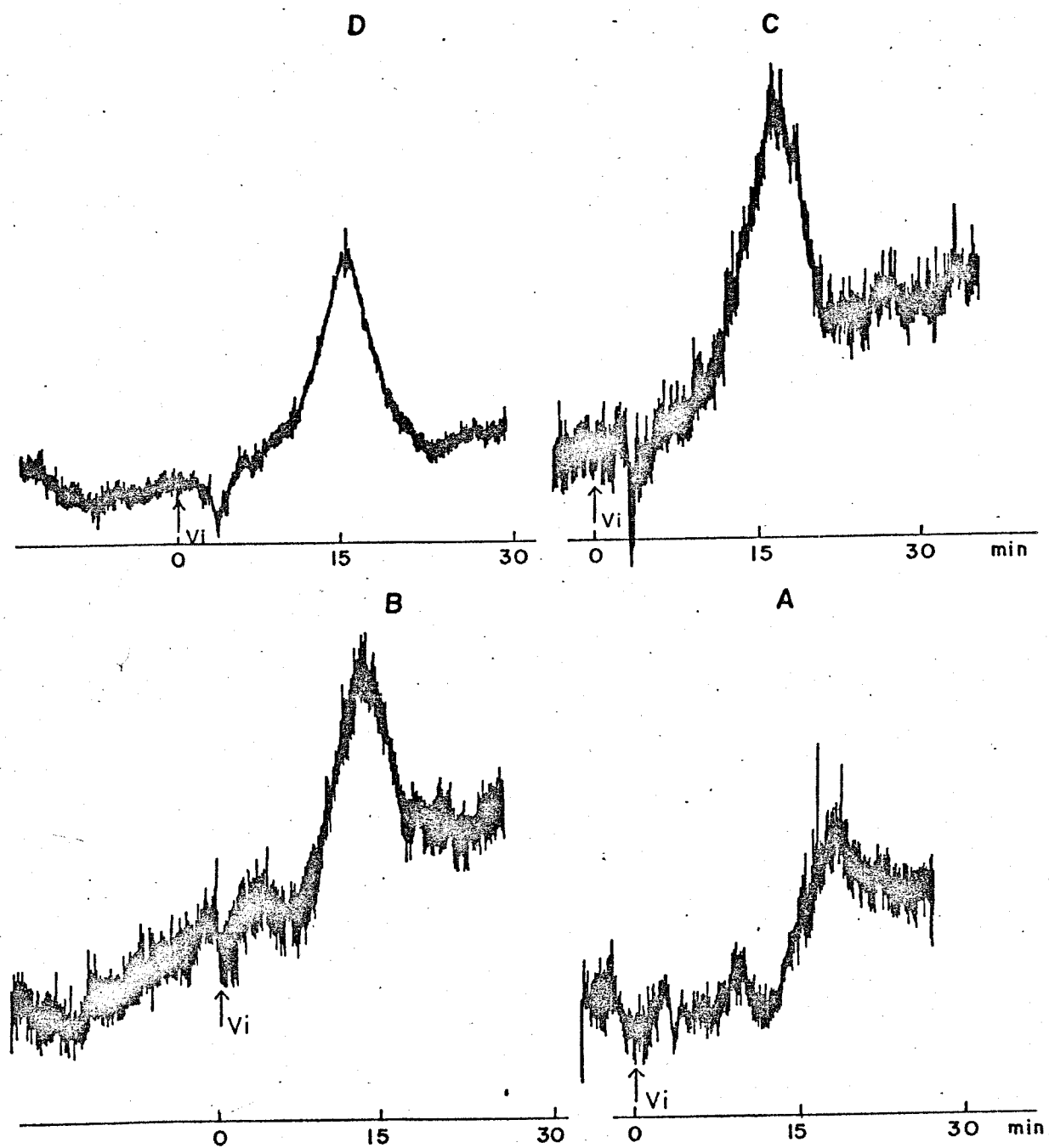


Figura 3.6.a. - Determinação de Cr(VI) com 1,5-difenilcarbazida pela técnica de derivatização pós-coluna em linha. As concentrações de Cr(III) injetado e as sensibilidades usadas são mostradas na Tabela 3.2.

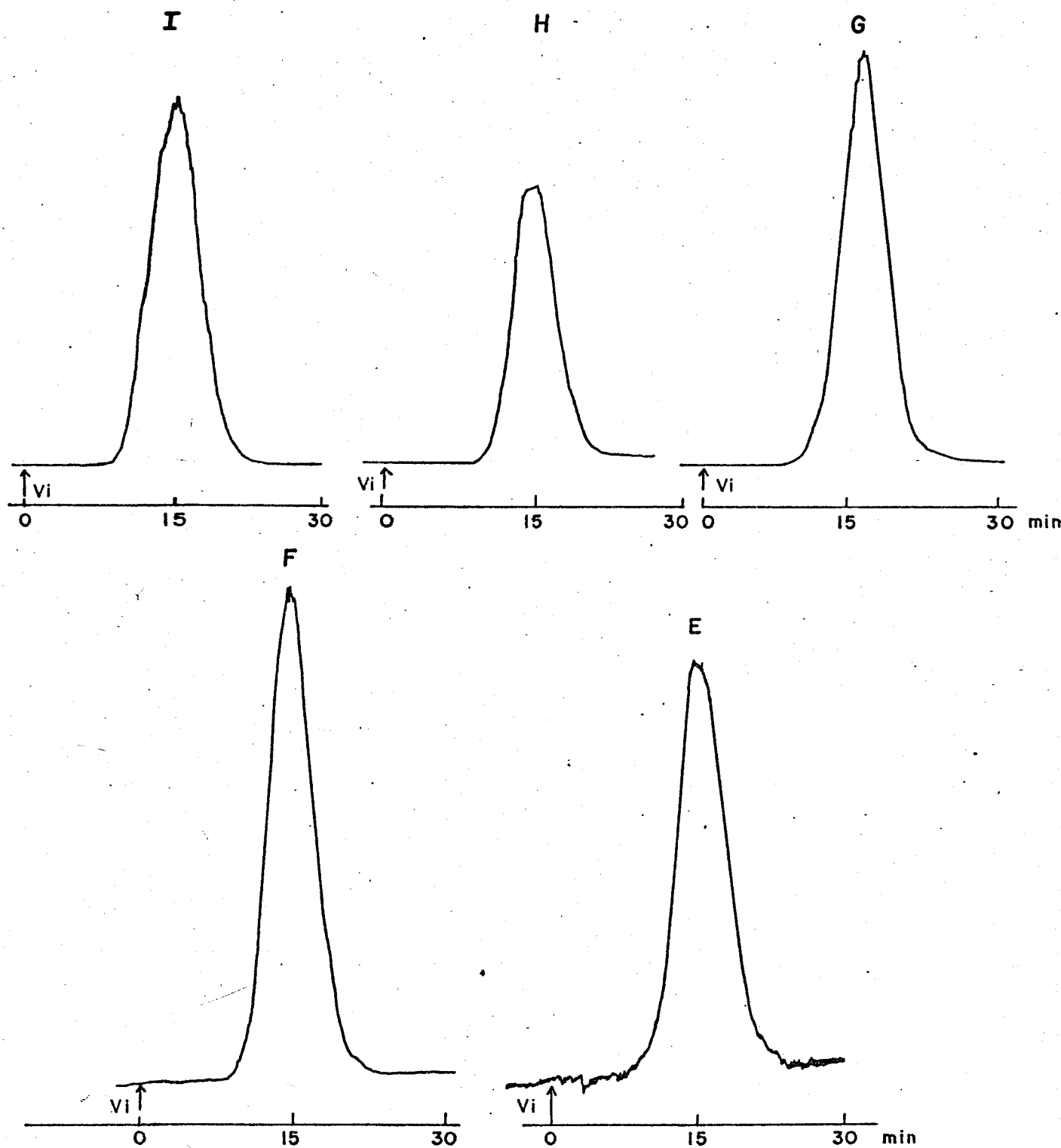


Figura 3.6.b. - Ver Figura 3.6.a.

onde: Área = área do pico (mm^2)

H = altura do pico (mm) medida da linha da base a intersecção das duas linhas tangentes traçadas ao longo dos lados do pico.

B = largura do pico na base (mm), medida pela intersecção das duas linhas tangentes com a linha da base.

A Tabela 3.2. ilustra os cálculos das áreas e das áreas corrigidas pela sensibilidade para os picos A à I das Figuras 3.6.a. e 3.6.b. utilizando o método da triangulação.

TABELA 3.2. Cálculo da área e da área corrigida dos picos das Figuras 3.6.a. e 3.6.b. utilizando o método da triangulação.

CROMATO-GRAMA	[Cr(III)] (mol/L)	Sens. (U.A.)	H (mm)	B (mm)	ÁREA (mm^2)	ÁREA CORR. (mm^2)
I	$1,0 \times 10^{-3}$	0,20	105	24	1260	252,0
H	$7,0 \times 10^{-4}$	0,20	96	24	1152	230,4
G	$5,0 \times 10^{-4}$	0,10	120	24	1440	144,0
F	$3,0 \times 10^{-4}$	0,05	125	23	1438	71,9
E	$1,0 \times 10^{-4}$	0,02	130	22	1430	28,6
D	$1,0 \times 10^{-5}$	0,01	56	25	700	7,0
C	$9,0 \times 10^{-6}$	0,005	65	26	845	4,2
B	$7,0 \times 10^{-6}$	0,005	52	26	676	3,4
A	$5,0 \times 10^{-6}$	0,005	34	28	476	2,4

Área Corr. - representa a área relativa dos picos, corrigidos pela sensibilidade da detecção.

As Figuras 3.7. e 3.8. mostram as curvas de calibração do Cr(III), utilizando a técnica de derivatização pós-coluna em linha para determinação de Cr(VI) com a 1,5-difenil - carbazida (DFC) usando os dados da Tabela 3.2. A curva de calibração, de uma concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L é descrita pela equação:

$$\text{Área Corr.} = (4,7 + 2,7 \times 10^5 [\text{Cr(III)}] (\text{mol.L}^{-1})) (\text{mm}^2)$$

com um coeficiente de correlação, $r = 0,9804$. Para concentrações de $5,0 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol/L, a curva de calibração é:

$$\text{Área Corr.} = (0,2 + 4,5 \times 10^5 [\text{Cr(III)}] (\text{mol.L}^{-1})) (\text{mm}^2)$$

com um coeficiente de correlação, $r = 0,9979$.

O limite prático de determinação é $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L com uma sensibilidade de 0,005 U.A. sendo que amostras mais diluídas apresentam picos com a relação sinal/ruído igual ou menor a um.

3.5. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.

Misturas contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) foram separadas por cromatografia de troca iônica empregando a resina AG 50W x-4 (< 400 mesh), em uma coluna de Kel-F de 50 x 4mm. A eluição das espécies monoméricas (M), diméricas (D) e triméricas (T) foi realizada com soluções de perclorato de cálcio 0,3; 0,5 e 1,0 mol/L respectivamente, a pH 2,0. A mudança de eluentes foi efetuada por meio de uma válvula sele

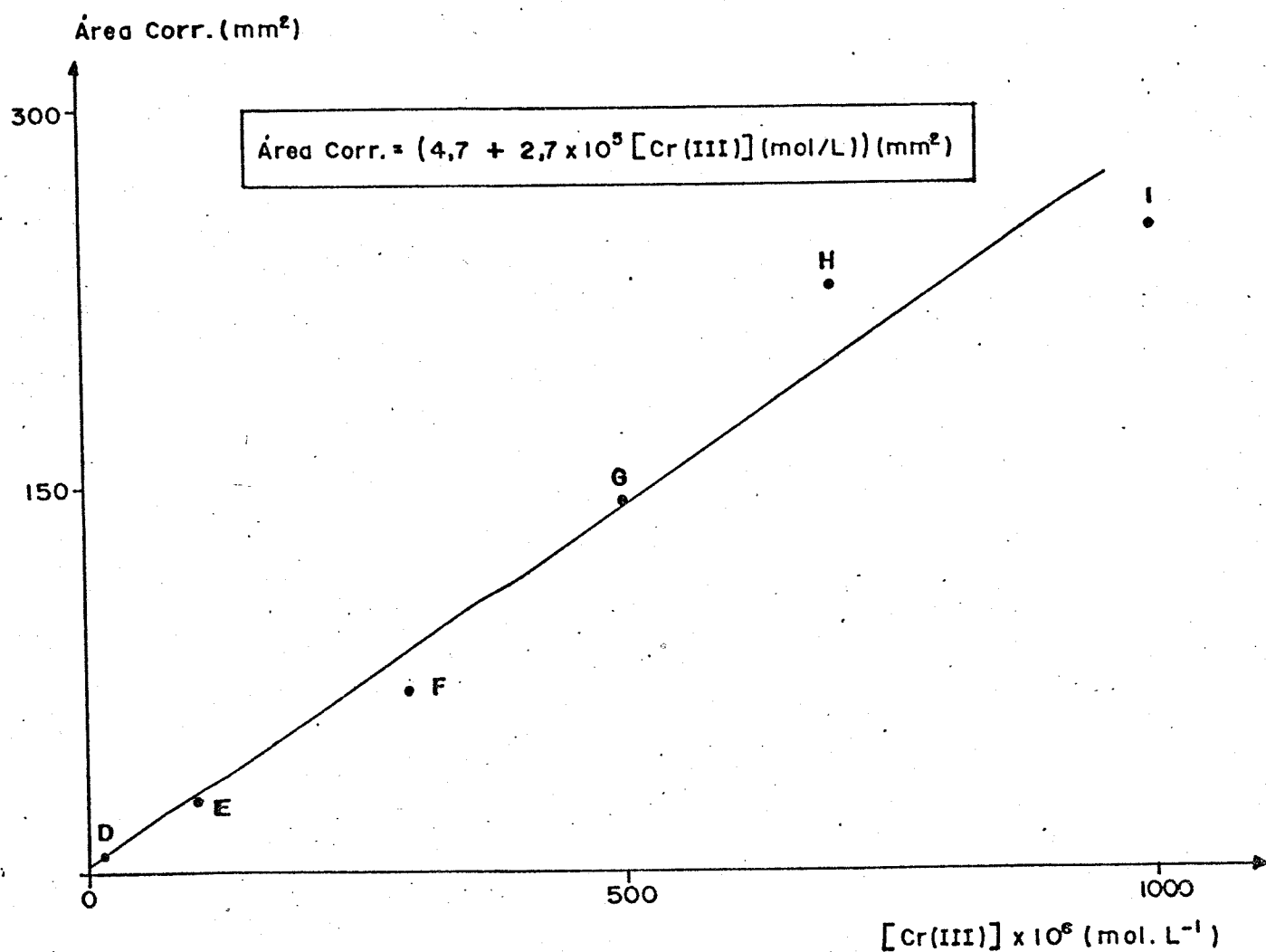


Figura 3.7. - Curva de calibração do Cr(III) com a 1,5-difenilcarbazona utilizando a técnica pós-coluna em linha.

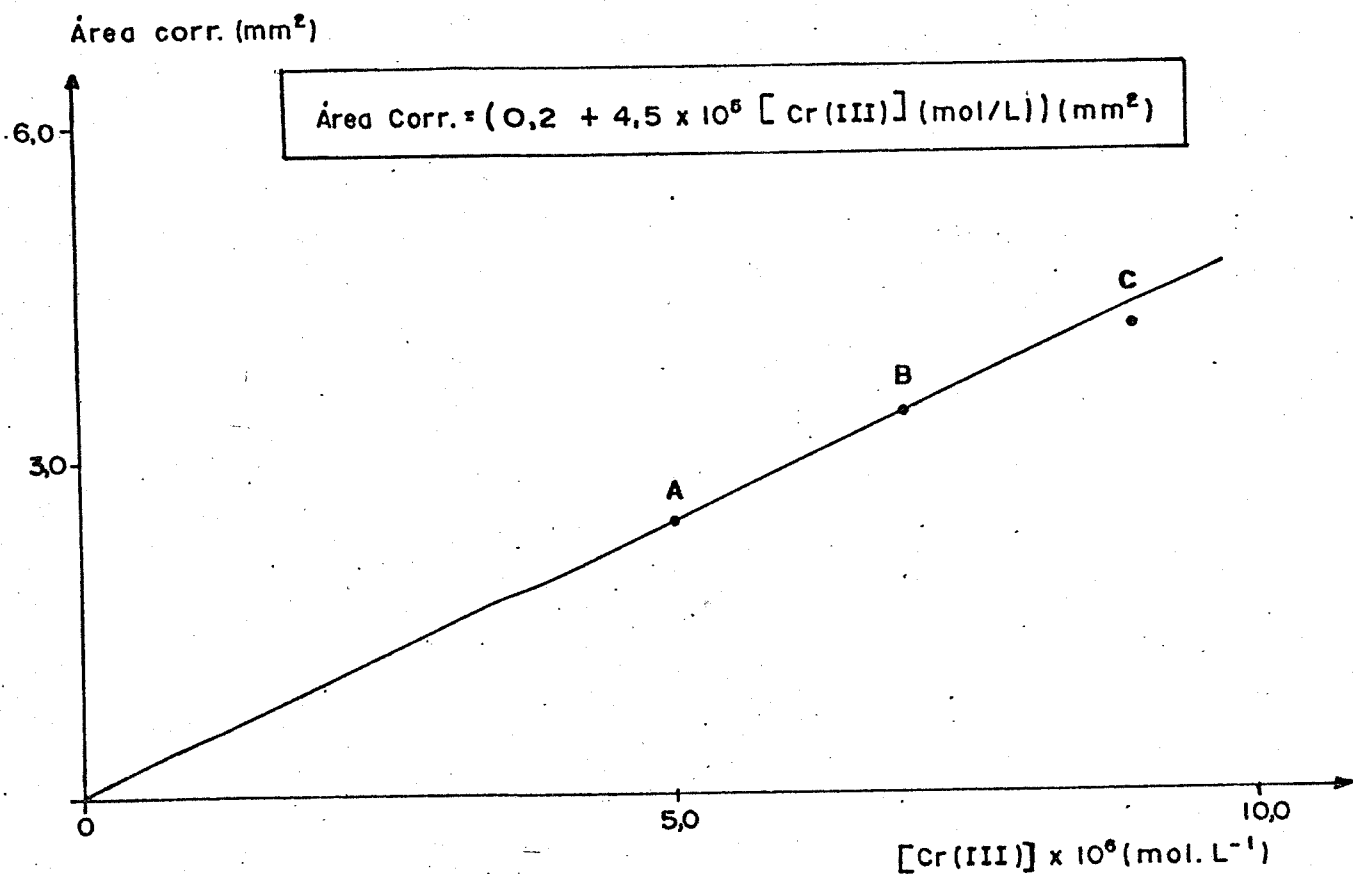


Figura 3.8. - Curva de calibração do Cr(III) com a 1,5-Difenilcarbazida utilizando a técnica pós-coluna em linha.

tora denominada seletor de solventes (Figura 2.2.).

As espécies eluídas foram determinadas espectrofotometricamente a 540nm, com a 1,5-difenilcarbazida (DFC) através do uso de reações pós-coluna em linha, utilizando o sistema descrito na Figura 2.4.

As condições utilizadas foram:

- Volume de solução de Cr(III) injetado de 50 μ L;
- Velocidade de fluxo da fase móvel de 0,5mL/min;
- Velocidade de fluxo dos reagentes pós-coluna de 0,5mL/min;
- Comprimento da bobina de oxidação (BO) de 5,0m;
- Temperatura de 45°C para a oxidação do Cr(III) em linha;
- Comprimento de onda de 540nm;
- Espectrofotômetro Waters.

As amostras contendo as espécies hidrolíticas de Cr(III) foram preparadas empregando o método da adição de hidróxido, conforme descrito na seção 2.1.4. Hidróxido de sódio 3mol/L foi adicionado gota a gota a cada uma de três soluções de perclorato de cromo de $1,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, preparadas por redução de uma solução de dicromato de potássio, até pH 4.

As Figuras 3.9., 3.10. e 3.11. mostram cromatogramas típicos obtidos injetando-se 50 μ L das respectivas amostras contendo uma mistura de espécies de Cr(III). No final de cada análise verificou-se uma coloração verde remanescente no topo da coluna indicando a presença de polímeros não eluídos.

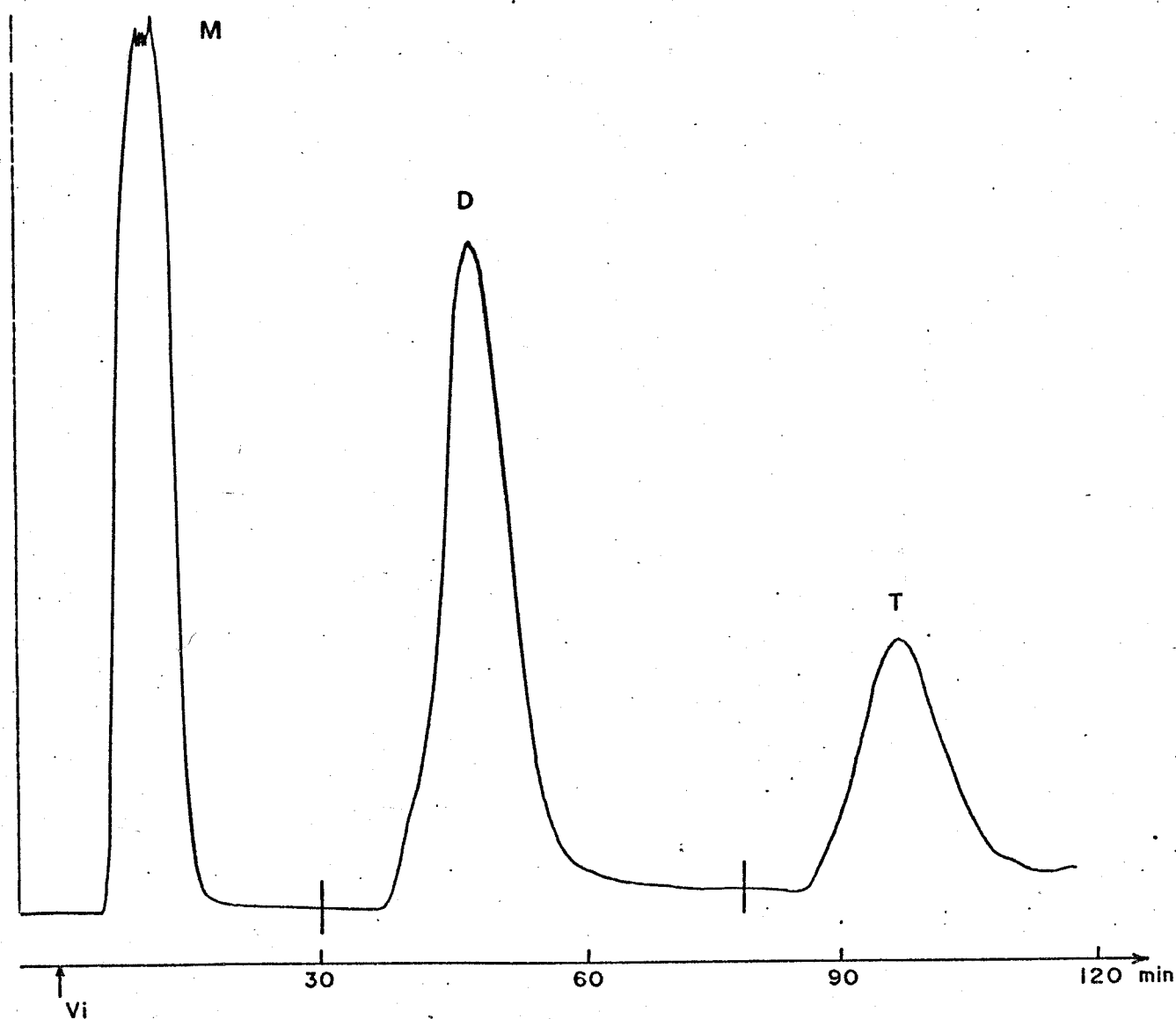


Figura 3.9. - Determinação espectrofotométrica de espécies hidrolíticas de Cr(III) por reação pós-coluna em linha. Amostra preparada de uma solução de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Volume injetado: $50 \mu\text{L}$.
Eluentes: M - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ $0,3 \text{ mol/L pH } 2$.
D - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ $0,5 \text{ mol/L pH } 2$.
T - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ $1,0 \text{ mol/L pH } 2$.

Sensibilidade (U.A.): $1,0(\text{M})$; $0,5(\text{D})$ e $0,5(\text{T})$.

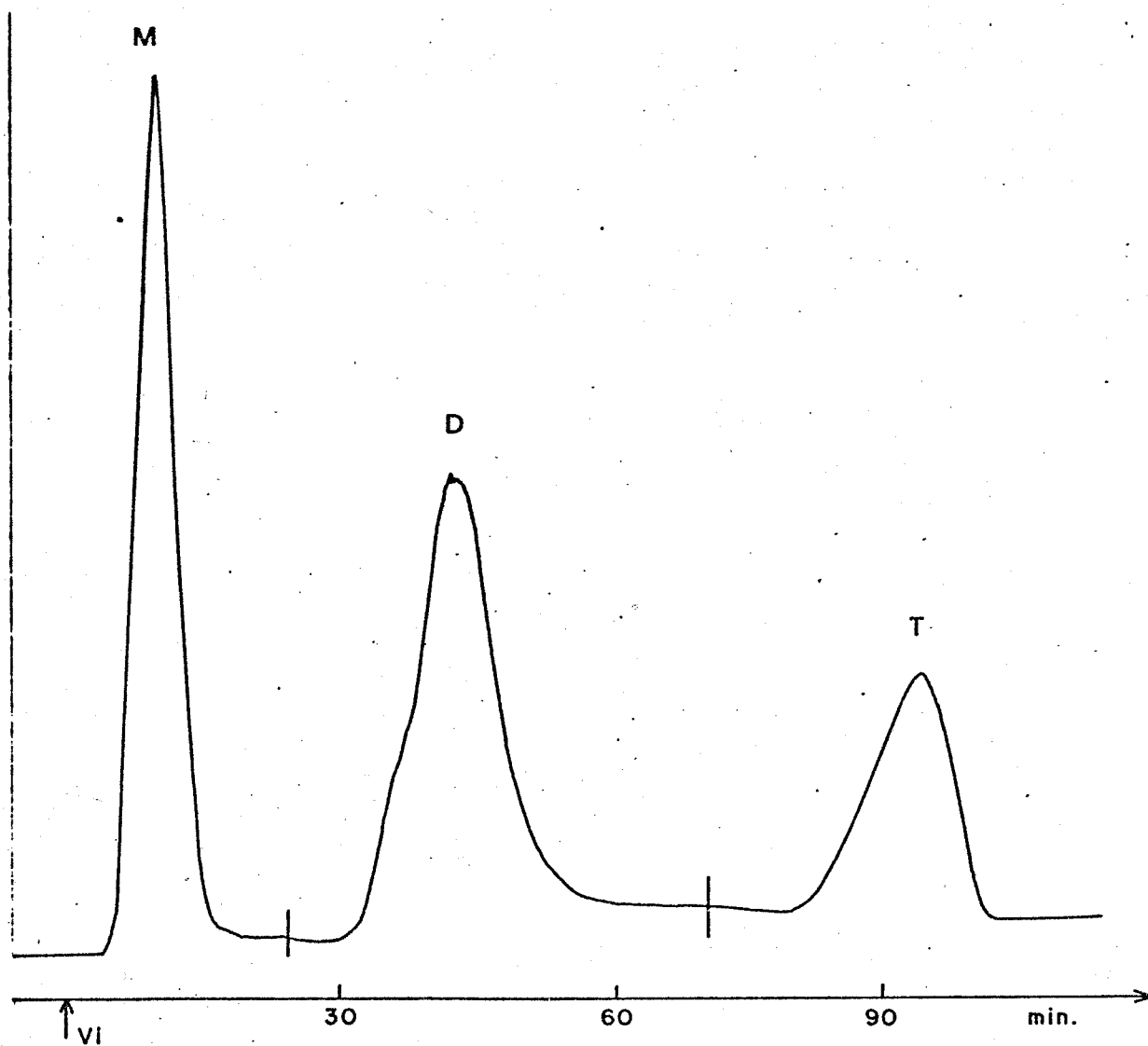


Figura 3.10. - Determinação espectrofotométrica de espécies hidrolíticas de Cr(III) por reação pós-colu na em linha. Amostra preparada de uma solução de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3$ $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Volume injetado: $50 \mu\text{L}$.
Eluentes: M - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,3 mol/L pH 2.
D - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,5 mol/L pH 2.
T - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 1,0 mol/L pH 2.
Sensibilidade (U.A.): 0,5(M); 0,10(D) e 0,10(T).

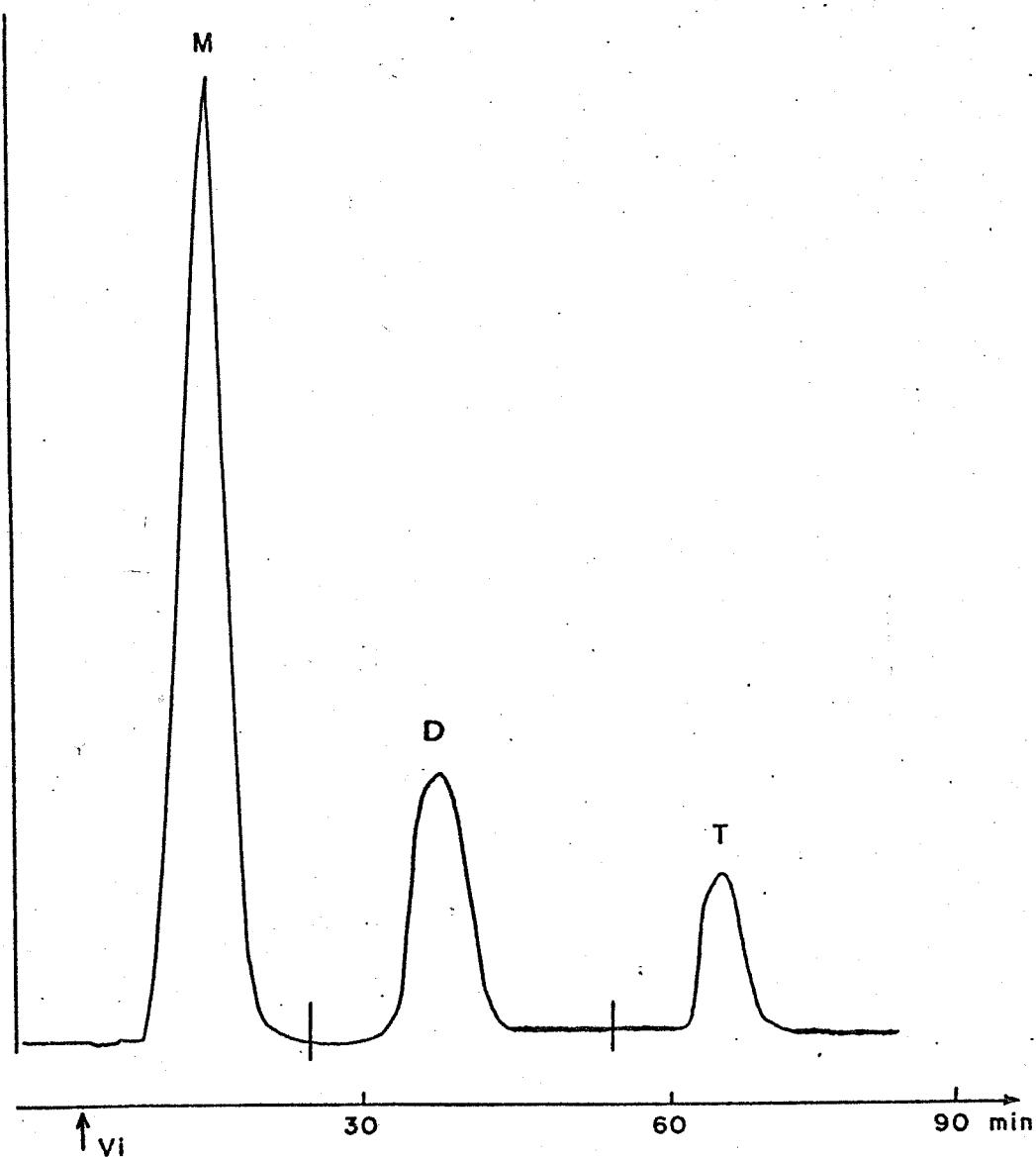


Figura 3.11. - Determinação espectrofotométrica de espécies hidrolíticas de Cr(III) por reação pós-colu na em linha. Amostra preparada de uma solução de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3$ $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Volume injetado: $50 \mu\text{L}$. Eluentes: M - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,3mol/L pH 2.
D - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,5mol/L pH 2
T - $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 1,0mol/L pH 2
Sensibilidade (U.A.): 0,05(M); 0,05(D) e 0,05(T).

A Tabela 3.3. mostra os cálculos das áreas, das áreas corrigidas pela sensibilidade e da composição de cada uma das espécies de Cr(III) monômero(M), dímero(D) e trímero(T) obtidos dos cromatogramas das Figuras 3.9., 3.10 e 3.11. As misturas de espécies de Cr(III) obtidas a partir de soluções de Cr(III) $1,0 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ foram denominadas X, Y e Z respectivamente.

TABELA 3.3. Cálculo da área, da área corrigida e da composição dos picos dos cromatogramas das Figuras 3.9.; 3.10. e 3.11., utilizando o método da triangulação.

MISTURA	[Cr(III)] (mol/L)	Sens. (U.A.)			H (mm)			B (mm)			Área (mm ²)			Área Corr. (mm ²)			%		
		M	D	T	M	D	T	M	D	T	M	D	T	M	D	T	M	D	T
X	$1,0 \times 10^{-3}$	1,0	0,5	0,5	175	145	55	17	24	35	1488	1740	963	1488	870	482	52,4	30,6	17,0
Y	$1,0 \times 10^{-4}$	0,5	0,1	0,1	170	95	50	15	28	30	1275	1330	750	638	133	75	75,0	16,0	9,0
Z	$1,0 \times 10^{-5}$	0,05	0,05	0,05	174	57	18	18	15	15	1566	428	263	78,3	21,4	13,1	69,4	19,0	11,6

Área Corr. - representa a área relativa dos picos, corrigidos pela sensibilidade da detecção.

C A P I T U L O 4

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr(VI) E Cr(III) POR IFC.

A determinação espectrofotométrica de Cr(VI) com a 1,5-difenilcarbazida (DFC), usando a técnica de injeção em fluxo contínuo e ácido perclórico para manter a acidez, mostrou resultados reprodutíveis em linha, como está indicado na Figura 3.2. A curva padrão para o Cr(VI) (Figura 3.3.), obtida usando-se o sistema IFC descrito na Figura 2.3., com um volume injetado de 50 μ L e ácido perclórico 0,8M em confluência com a solução de DFC 0,05%(m/v), é linear até pelo menos 4,0 μ g.mL⁻¹ (Absorb. = $1,1 \times 10^{-2} + 1,0 \times 10^{-1}[\text{Cr(VI)}]$ (μ g.mL⁻¹) com coeficiente de correlação $r = 0,9993$).

Comparando-se estes dados com os fornecidos pelo método estático convencional (54,55), que usa H₂SO₄ para manter a acidez, e cuja curva de calibração é linear pelo menos até 1,2 μ g.mL⁻¹ (Absorb. = $1,2 \times 10^{-2} + 7,4 \times 10^{-1}[\text{Cr(VI)}]$ (μ g.mL⁻¹) com coeficiente de correlação $r = 0,9982$), observa-se que a determinação de Cr(VI) é mais precisa pelo método IFC, embora o método convencional tenha uma concentração mínima detectável menor.

Trabalhos anteriores (51-53), utilizando o método IFC para determinações de Cr(VI) com a 1,5-difenilcarbazida (DFC), HNO_3 0,80M para manter a acidez e um volume injetado de $164\mu\text{L}$ mostraram resultados semelhantes ($\text{Absorb.} = 6,7 \times 10^{-3} + 2,8 \times 10^{-1} [\text{Cr(VI)}] (\mu\text{g.mL}^{-1})$ com coeficiente de correlação $r = 0,9998$), com um limite de detecção menor, comparados com os nossos resultados. Podemos concluir, portanto, que o aumento da altura do pico (sinal IFC) e, conseqüentemente, o limite de detecção do método não é proporcional ao aumento do volume de amostra injetado (V_i) para todos os intervalos de concentração de Cr(VI).

Para o Cr(III), a curva padrão obtida (Figura 3.5), usando-se o sistema IFC descrito na Figura 3.3, com volume injetado de $50\mu\text{L}$, HClO_4 0,80M em confluência com a solução de DFC 0,05% (m/v) e solução de $\text{Ce(SO}_4)_2$ 0,025% (m/v) em H_2SO_4 0,07M para efetuar a oxidação do Cr(III) para Cr(VI), é linear até pelo menos $4,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\text{Absorb.} = 9,5 \times 10^{-4} + 8,1 \times 10^{-2} [\text{Cr(III)}] (\mu\text{g.mL}^{-1})$ com coeficiente de correlação $r = 0,9956$).

Comparando-se estes dados com os fornecidos pelo mesmo método (51-53), ($V_i = 164\mu\text{L}$; HNO_3 0,80M em confluência com a solução de DFC 0,05% (m/v), e solução de $\text{Ce(SO}_4)_2$ 0,025% (m/v) em H_2SO_4 0,07M), e cuja curva padrão é linear até $4,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\text{Absorb.} = 3,7 \times 10^{-3} + 1,2 \times 10^{-1} [\text{Cr(III)}] (\mu\text{g.mL}^{-1})$, coeficiente de correlação $r = 0,9981$), concluímos uma vez mais que o limite de detecção do método não é proporcional ao aumento do volume de amostra injetado (V_i), embora possa afetar a precisão do método.

4.2. A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO Cr(III) MONÔMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.

Neste procedimento tornou-se necessário substituir o tubo de polietileno que constitui a bobina de oxidação (BO) por um tubo de Teflon de diâmetro interno reduzido (0,3mm) e comprimento de 5,0m, conforme Figura 3.4, com o objetivo de se obter um menor alargamento da banda. No entanto, sabemos que o uso de tubos de diâmetro interno reduzido produz uma queda de pressão (ΔP) considerável, o que ocasionará, por sua vez, problemas nas linhas de transmissão, bobina de oxidação (BO), bobina de mistura (BM) e bobina de reação (BR).

Com o intuito de sanar este problema foram utilizados dois conectores de aço inox (Ca), como se encontra esquematizado na Figura 2.4. O primeiro conector de aço inox foi utilizado no encontro das linhas do efluente da coluna (Cr(III) eluído da coluna analítica) com a linha do agente oxidante, o Ce(IV), e o segundo conector foi usado no encontro dos fluxos do agente complexante (DFC em meio de HClO_4) com o fluxo proveniente da bobina de oxidação (BO).

As curvas padrão para o Cr(III) monômero, obtidas pelo acoplamento da coluna cromatográfica com o sistema de reação pós-coluna em linha (Figura 2.4.), com um volume injetado de Cr(III) de 50 μL , perclorato de cálcio 0,3M como eluente e as mesmas condições de trabalho citadas anteriormente (item 4.1.) para os reagentes pós-coluna, são mostradas nas Figuras 3.7. e 3.8.

A Figura 3.7, representa a curva de calibração de Cr(III) na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$,

referentes aos cromatogramas D, E, F, G, H e I, das Figuras 3.6.a e 3.6.b, sendo descrita pela equação : Área corr. = $(4,7 + 2,7 \times 10^5 [\text{Cr(III)}] (\text{mol.L}^{-1})) \text{mm}^2$, com coeficiente de correlação $r = 0,9804$, onde Área corr. representa a área medida no cromatograma corrigida pela sensibilidade de detecção, ou mais especificamente, a área ajustada pelo valor da atenuação no detector espectrofotométrico.

A Figura 3.8. representa a curva de calibração para concentrações de Cr(III) na faixa de $5,0 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$ referentes aos cromatogramas A, B e C da Figura 3.6.a, sendo descrita pela equação Área corr. = $(0,2 + 4,5 \times 10^5 [\text{Cr(III)}] (\text{mol.L}^{-1})) \text{mm}^2$, com coeficiente de correlação $r = 0,9979$.

A tabela 3.2, fornece os dados das áreas relativas dos cromatogramas A, B, C, D, E, F, G, H e I, das Figuras 3.6.a e 3.6.b, ajustados pela sensibilidade de detecção (Área corr.), em função da concentração de Cr(III) injetado na coluna analítica.

A curva que engloba todos estes valores é mostrada na Figura 4.1, sendo descrita pela equação: Área corr. = $(2,9 + 2,7 \times 10^5 [\text{Cr(III)}] (\text{mol.L}^{-1})) \text{mm}^2$ com $r = 0,9871$.

4.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III) MONÔMERO, DÍMERO E TRÍMERO, POR REAÇÃO PÓS-COLUNA EM LINHA.

Neste procedimento foram preparadas três misturas de espécies hidrolíticas de Cr(III), denominadas de X, Y e Z, a partir de soluções de Cr(III) $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Estas amostras foram prepara-

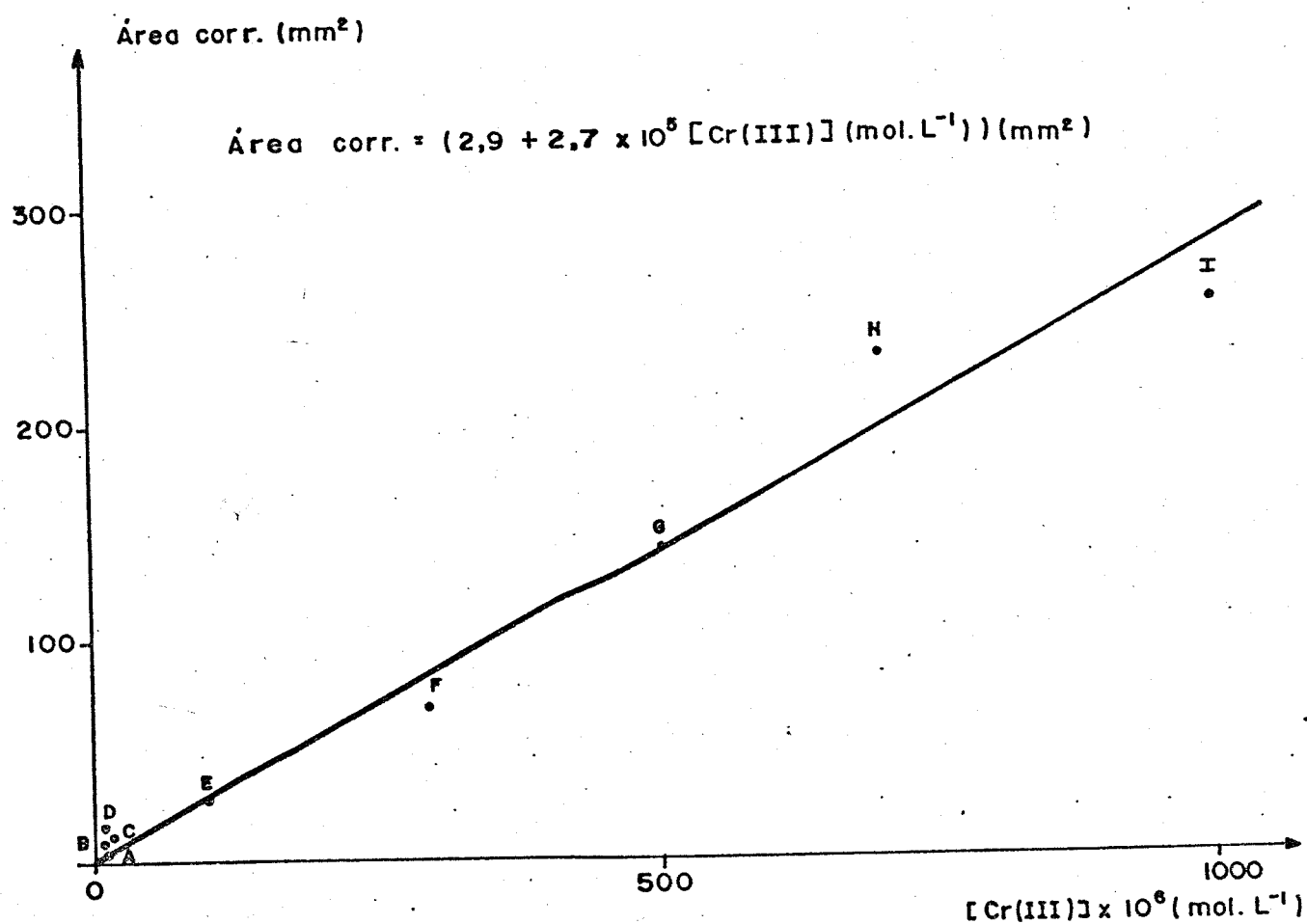


Figura 4.1. - Curva de calibração do Cr(III) monômero, com a 1,5-difenilcarbazida utilizando a técnica pós-coluna em linha.

das empregando-se o método da adição de hidróxido descrito no item 2.1.4.

A eluição das espécies monomérica (M), dimérica (D) e trimérica (T) foi efetuada com $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 0,3; 0,5 e 1,0 mol.L^{-1} a pH 2, respectivamente, e as frações eluídas foram detectadas espectrofotometricamente, após reação pós-coluna em linha com a 1,5-difenilcarbazida, a 540nm, utilizando o sistema descrito na Figura 2.4.

As Figuras 3.9; 3.10 e 3.11. mostram os cromatogramas típicos obtidos injetando-se 50 μL de cada uma das misturas X, Y e Z de espécies hidrolíticas de Cr(III), em função do tempo de eluição em minutos. A tabela 3.3 nos fornece as áreas dos picos, calculadas utilizando o método da triangulação, a área relativa dos picos, ajustados pela sensibilidade da detecção (Área corrigida) e a porcentagem de cada espécie de Cr(III) nas misturas X, Y e Z. Neste caso a porcentagem foi calculada supondo que cada uma das misturas X, Y e Z contém somente as espécies monomérica, dimérica e trimérica, uma vez que trabalhos anteriores (10), utilizando espécies hidrolíticas de Cr(III) marcadas com ^{51}Cr , com nitrato de cálcio em diferentes concentrações como eluente, indicam que a quantidade de polímeros retidos pela resina é inferior a 1%.

As quantidades das espécies monomérica (M), dimérica (D) e trimérica (T) nas misturas X, Y e Z decrescem na ordem: $\%M > \%D > \%T$, sendo este fato mais pronunciado na mistura Y, preparada a partir de uma solução de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3$ $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L^{-1} , como se pode verificar nos dados da tabela 3.3.

Dados fornecidos pela literatura (10) utilizando uma solução de $\text{Cr}(\text{ClO}_4)_3$ $0,1\text{mol.L}^{-1}$ contendo monômero marcado com ^{51}Cr , e usando o método da adição de hidróxido para preparação da amostra indicam uma distribuição de espécies diferentes da observada por nós, onde a porcentagem do dímero obtida (76,3%) foi bem maior que a de monômero (19,0%) e esta maior que a do trímero (3,8%), ou seja, a ordem decrescente das espécies foram: %D >> %M > %T.

Em nosso caso, as concentrações das soluções de $\text{Cr}(\text{III})$ foram menores e sempre obtivemos maiores quantidades de monômero. Não foi feito um estudo sobre a influência da diluição nas quantidades das espécies, no entanto, podemos concluir que o método é viável e de relativamente pouco custo.

C A P Í T U L O 5

5. CONCLUSÕES

A separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) foi realizada através de uma coluna cromatográfica feita de um tubo de Kel-F, de 50 x 4mm recheada com uma resina de troca catiônica fortemente ácida da Bio Rad AG 50W x-4 (< 400 mesh) utilizando como eluentes soluções de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ em concentrações de 0,3; 0,5 e 1,0 mol.L⁻¹ todas em ácido perclórico pH 2,0.

A detecção e quantificação das espécies hidrolíticas separadas — monômero, dímero e trímero respectivamente — foram obtidas usando um detector espectrofotométrico.

Quando o detector foi acoplado diretamente a coluna, os picos foram registrados em 415nm, a quantidade mínima detectável foi 0,1 mol.L⁻¹.

O limite de detecção é reduzido quando as espécies de Cr(III) são oxidadas, em linha, à Cr(VI), antes da reação com a 1,5-difenilcarbazida (DFC). O complexo Cr(VI)-DFC é medido a 540nm. O limite prático de detecção neste caso é $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

A análise de três amostras nos forneceu distribuições de espécies onde %M > %D > %T.

O tempo necessário para eluição e detecção das 3 espécies foi de aproximadamente 100 minutos, mesmo tempo requerido pelo método radioanalítico somente para a coleta das frações eluídas da coluna.

O processo de reação pós-coluna produz um alargamento da banda provocado por efeitos extra-coluna (diâmetro interno do tubo reator, tempo de residência, etc.), mas reduz sensivelmente o limite de detecção das espécies hidrolíticas de Cr(III).

- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. J. A. Laswick e R. A. Plane, J. Am. Chem. Soc., 81, 3564 (1959).
02. M. Ardon e R. A. Plane, J. Am. Chem. Soc., 81, 3197 (1959).
03. M. Ardon e A. Linenberg, J. Phys. Chem., 65, 1443 (1961).
04. P. Gutlich e G. Harbottle, Radiochim. Acta., 5, 70 (1966).
05. R. E. Ackerhalt, C. H. Collins e K. E. Collins, Trans. Faraday Soc., 65, 1927 (1969).
06. R. E. Ackerhalt, C. H. Collins e K. E. Collins, Trans. Faraday Soc., 67, 1459 (1971).
07. C. H. Collins, K. E. Collins e R. E. Ackerhalt, J. Radioanal. Chem., 8, 263 (1971).
08. M. E. Thompson e R. E. Connick, Inorg. Chem., 20, 2279 (1981).
09. J. E. Finholt, M. E. Thompson e R. E. Connick, Inorg. Chem., 20, 4151 (1981)..
10. P. S. Bonato, "Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para a Separação de Espécies Hidrolíticas de Cr(III)"; Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 1986.
11. J. X. Khym, "Analytical Ion Exchange Procedures in Chemistry and Biology - Theory, Equipment, Techniques", Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1974.

12. L. R. Snyder e J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2^a ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1979.
13. H. Stunzi e W. Marty, Inorg. Chem., 22, 2145 (1983).
14. R. W. Kolaczowski e R. A. Plane, Inorg. Chem., 3, 322 (1964).
15. H. H. Willard e P. Young, J. Am. Chem. Soc., 51, 149 (1929).
16. M. Ardon e G. Stein, J. Chem. Soc., 2059 (1956).
17. W. M. Thorton Jr. e J. F. Sadusk Jr., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 4, 240 (1932).
18. T. F. Bueher e O. E. Schupp, Ind. Eng. Chem., 18, 121 (1926).
19. J. J. Lingane e R. L. Pecsock, Anal. Chem., 20, 425 (1948).
20. J. P. Hunt e H. Taube, J. Chem. Phys., 19, 602 (1951).
21. I. Dellien, F. M. Hall e L. G. Hepler, Chem. Rev., 76, 283 (1976).
22. H. T. Hall e H. Eyring, J. Am. Chem. Soc., 72, 782 (1950).
23. K. E. Collins, J. C. de Andrade e C. H. Collins, Radiochim. Acta., 29, 117 (1981).
24. K. E. Collins, J. C. de Andrade e C. H. Collins, Radiochim. Acta., 35, 71 (1984).
25. J. F. Lawrence e R. W. Frei, "Chemical Derivatization in Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1976.

26. K. Blau e G. S. King (Editors), "Handbook of Derivatives for Chromatography", Heyden & Son, London, 1977.
27. J. Ruter, U. P. Fislage e B. Neidhart, *Chromatographia* , 19, 62 (1984).
28. R. W. Frei, W. Santi e M. Thomás, *J. Chromatogr.*, 116, 365 (1976).
29. J. F. Lawrence, *J. Chromatogr. Sci.*, 17, 113 (1979).
30. R. W. Frei, H. Jansen e U. A. Th. Brinkman, *Anal. Chem.*, 57, 1529A (1985).
31. F. Nachtmann e H. Spitzzy, *Anal. Chim. Acta*, 76, 57 (1975)
32. R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 165, 75 (1979).
33. S. Elchuk e R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, 51, 1434 (1979).
34. J. C. Gfeller, G. Frey e R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 142, 271 (1977).
35. R. W. Frei e W. Santi, *Z. Anal. Chem.*, 277, 303 (1975).
36. R. W. Frei, L. Michel e W. Santi, *J. Chromatogr.*, 126, 665 (1976).
37. T. D. Schlabach, S. H. Chang, K. M. Gooding e F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 134, 91 (1977).
38. J. S. Fritz e N. Story, *Anal. Chem.*, 46, 825 (1974).
39. R. M. Cassidy e S. Elchuk, *J. Chromatog. Sci.*, 18, 217 (1980).

40. R. M. Cassidy e S. Elchuk, J. Chromatog. Sci., 19, 503 (1981).
41. T. M. Vickrey, "Liquid Chromatography Detectors", Elsevier, Amsterdam, 1983.
42. J. F. Studebaker, J. Chromatogr., 185, 497 (1979).
43. J. Ruter e B. Neidhart, Mikrochim. Acta., I, 271 (1984).
44. L. J. Skeegs, Am. J. Clin. Pathol., 28, 311 (1957).
45. R. S. Deelder e P. J. H. Hendricks, J. Chromatogr., 83, 343 (1973).
46. G. Ertinghaues, H. J. Alder e A. S. Reichler, J. Chromatogr., 42, 355 (1969).
47. L. R. Snyder e H. J. Alder, Anal. Chem., 48, 1017 (1976).
48. L. R. Snyder, J. Chromatogr., 125, 287 (1976).
49. W. B. Guenther, "Química Quantitativa (Medições e Equilíbrio)", Editora Blücher, São Paulo, 1973.
50. A. F. Clifford, "Inorganic Chemistry of Qualitative Analysis", Prentice - Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1961.
51. J. C. Andrade, J. C. Rocha, C. Pasquini e N. Baccan, Analyst, 108, 621 (1983).
52. J. C. Andrade, J. C. Rocha e N. Baccan, Analyst, 109, 645 (1984).
53. J. C. Andrade, J. C. Rocha e N. Baccan, Analyst, 110, 197 (1985).

54. Z. Marczenko, "Spectrophotometric Determination of Elements", Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1976.
55. E. B. Sandell, "Colorimetric Determination of Metals", Interscience Publishers, New York, 1959, pag. 257-270.
56. D. M. Yost, J. Am. Chem. Soc., 48, 152 (1926).
57. D. A. House, Chem. Rev., 62, 185 (1962).
58. G. J. Jong e V. A. Th. Brinkman, Anal. Chem. Acta., 98, 243 (1978).
59. J. F. Pankow e G. E. Janaver, Anal. Chim. Acta, 69, 97 (1974).
60. R. E. Cranston e J. W. Murray, Anal. Chim. Acta, 99, 275 (1978).
61. D. Naranjit, Y. Thomassen e J. C. Van Loon, Anal. Chim. Acta, 110, 307 (1979).
62. A. Miyasaki e R. M. Barnes, Anal. Chem., 53, 299 (1981).
63. I. S. Krull, D. Bushes, R. N. Savage, R. G. Scheicher e S. B. Smith, Anal. Lett., 15, 267 (1982).
64. H. Yamazaki, Anal. Chim. Acta, 113, 131 (1980).
65. W. G. Bryson e C. M. Goodall, Anal. Chim. Acta, 124, 391 (1981).
66. M. Aoyama, T. Hobo e S. Suzuki, Anal. Chim. Acta, 129, 237 (1981).
67. M. Bose, Anal. Chim. Acta, 10, 201 (1954).