

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde a  
redação final da Tese defendida por  
Pierina Sueli Bonato e Aprovado pela  
Comissão Julgadora.

24 de July, 1986

Kenneth E. Collins

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
CROMATOGRAFICOS PARA A SEPARAÇÃO  
DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III)"

Pierina Sueli Bonato

Orientador: Prof. Dr. Kenneth E. Collins

TESE DE DOUTORADO

1986

A meus pais com  
muita gratidão  
por todo apoio.

Aos meus sobrinhos, com cari-  
nho.

Ao Roberto pelo carinho,  
compreensão e incentivo

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Kenneth E. Collins, pela orientação, apoio e incentivo.
- À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela minha liberação para realização deste trabalho.
- À diretoria dos Instituto de Química da UNICAMP, pela oportunidade concedida.
- À Dow Química S.A., pela bolsa de estudo e auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.
- Aos professores do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela amizade.
- À prof. Carol H. Collins, pelas discussões e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho.
- Aos colegas de grupo: Valin, Bertran, Guadalupe, Cida, Marta, Abigail, Cristini, Luis Fernando e Cristina, pela amizade.
- À Eliana, pela amizade e colaboração na correção da tese.
- A todos os professores e demais colegas do departamento de química analítica, de maneira especial a Bell (II) e João Carlos, pela cooperação.
- Ao Joãozinho, pela ajuda no laboratório.

## ÍNDICE GERAL

RESUMO

ABSTRACT

## CAPÍTULO 1

ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III).....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Preparação de espécies hidrolíticas de Cr(III).....	2
1.3 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III).....	6
1.4 Determinação da estrutura das espécies hidrolíticas de Cr(III).....	9

## CAPÍTULO 2

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA.....	18
2.1 Introdução.....	18
2.2 Cromatografia por troca iônica.....	20
2.2.1 Cromatografia por troca iônica clássica....	22
2.2.1.1 Propriedades físicas das resinas...	24
2.2.1.2 Propriedades químicas das resinas..	25
2.2.1.3 Outros tipos de cromatografia empregando resinas de troca iônica.....	27
2.2.1.4 Outros materiais empregados em cromatografia por troca iônica clássica.....	28
2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	

com fase estacionária de troca iônica.....	31
2.2.2.1 Características da fase móvel e estacionária empregadas em cromatografia por troca iônica.....	35
2.2.2.2 Enchimento de colunas.....	39

### CAPÍTULO 3

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EMPREGANDO COLUNAS COM MICRODIÂMETRO.....	44
3.1 Introdução.....	44
3.2 Vantagens na utilização de colunas com microdiâmetro...	47
3.3 Necessidades instrumentais na utilização de colunas com microdiâmetro.....	51
3.4 Eluição com gradiente.....	53
3.5 Enchimento de colunas com microdiâmetro.....	54

### CAPÍTULO 4

OBJETIVOS.....	56
----------------	----

### CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL.....	58
5.1 Reagentes.....	58
5.2 Fases estacionárias e colunas.....	59
5.3 Instrumental.....	60
5.4 Preparação de amostras.....	63

5.5 Tratamento de resinas de troca catiônica.....	66
5.6 Enchimento das colunas empregadas em CLAE.....	67
5.7 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregan- do resinas de troca catiônica.....	70
5.8 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregan- do CLAE.....	71
5.9 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregan- do colunas com microdiâmetro.....	72

## CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	73
6.1 Preparação de amostras.....	73
6.1.1 Método da adição de hidróxido.....	73
6.1.2 Método do redutor de Jones.....	74
6.2 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregan- do resinas de troca iônica.....	76
6.2.1 Desenvolvimento do método do nitrato de cálcio...	76
6.2.2 Utilização do método do nitrato de cálcio no estu- do da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III).....	86
6.2.3 Utilização de resinas de troca catiônica em colu- nas de politetrafluoretileno.....	88
6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência empregando co- lunas de troca iônica.....	93
6.3.1 Resultados obtidos com a coluna "a".....	93
6.3.2 Resultados obtidos com a coluna "b".....	98
6.3.3 Resultados obtidos com a coluna "c".....	98
6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência empregando co-	

Colunas com microdiâmetro.....	104
6.4.1 Colunas de 1 mm de diâmetro interno.....	107
6.4.2 Colunas de 2 mm de diâmetro interno.....	112
6.4.3 Estabilidade das espécies hidrolíticas de Cr(III) em presença de perclorato de lantânio.....	120
6.4.4 Estudo da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem.....	121
6.5 Identificação das espécies.....	128

## CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES.....	137
-----------------	-----

## CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
---------------------------------	-----

APÊNDICES.....	148
----------------	-----

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Valores de pKa para as espécies hidrolíticas de Cr(III).....	14
Tabela 1.2 Valores de $\lambda_{\max}$ e $\epsilon$ para as espécies hidrolí- ticas de Cr(III).....	16
Tabela 2.1 Características de alguns trocadores iônicos ba- seados em celulose.....	30
Tabela 2.2 Comparação entre os diferentes tipos de fase es	

	tacionária para cromatografia por troca iônica.	39
Tabela 6.1	Estabilidade das espécies em presença de nitrato de cálcio.....	84
Tabela 6.2	Estabilidade de uma amostra contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem (pH $\cong$ 1).....	86
Tabela 6.3	Estabilidade de uma amostra contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem (pH $\cong$ 3).....	87
Tabela 6.4	Estabilidade de uma amostra preparada segundo o método da adição de hidróxido, em função do tempo de estocagem.....	88
Tabela 6.5	Distribuição das espécies hidrolíticas de Cr(III) (%) utilizando dois métodos de análise.	96
Tabela 6.6	Condições de enchimento de colunas de 1x250 mm	109
Tabela 6.7	Análise de uma amostra contendo espécies hidrocacas de Cr(III), marcadas com <sup>51</sup> Cr, empregando colunas de 2 mm de diâmetro interno.....	117
Tabela 6.8	Estabilidade das espécies hidrolíticas de Cr(III) em presença de perclorato de lantânio..	121
Tabela 6.9	Preparação de amostras contendo espécies hidrolíticas de Cr(III).....	122
Tabela 6.10	Análise dos picos eluidos da coluna de 4,6 mm de diâmetro interno pelo método do nitrato de cálcio.....	132
Tabela 6.11	Análise dos picos eluidos de uma coluna de 2 mm de diâmetro interno, pelo método do nitrato de cálcio.....	133
Tabela 6.12	Comparação entre duas análises pelo método do nitrato de cálcio usando colunas de diferentes	

alturas.....	134
--------------	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema do processo de troca iônica em um trocador catiônico.....	21
Figura 2.2	Estrutura de resinas de troca catiônica (a) e aniônica (b).....	23
Figura 3.1	Influência do volume da cela do detector na largura dos picos obtidos com colunas de 4.6 (a) e 1 mm (b) de diâmetro interno.....	52
Figura 5.1	Esquema da bomba empregada no enchimento das colunas utilizadas em CLAE.....	69
Figura 6.1	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método convencional.....	78
Figura 6.2	Eluição de espécies hidrolíticas de Cr(III) em resina AG 50W X-8, partículas de 106-250 $\mu$ m....	80
Figura 6.3	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método do nitrato de cálcio.....	82
Figura 6.4	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando colunas de teflon e fosfato de sódio como eluente.....	90
Figura 6.5	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando colunas de teflon e nitrato de cálcio como eluente.....	91
Figura 6.6	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando coluna de teflon recheada com resina AG 50W X-12, partículas de 38-63 $\mu$ m.....	92
Figura 6.7	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III)	

	empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44 $\mu\text{m}$ , e fosfato de sódio como eluyente.....	95
Figura 6.8	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44 $\mu\text{m}$ e nitrato de cálcio como eluyente.....	97
Figura 6.9	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44 $\mu\text{m}$ e perclorato de cálcio como eluyente.....	99
Figura 6.10	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando perclorato de lantânio como eluyente.	100
Figura 6.11	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando uma coluna recheada com Partisil 10 SCX, partículas de 10 $\mu\text{m}$ .....	103
Figura 6.12	Eficiência (n/m) em função da vazão da fase mó- vel (ml/min) obtida para a coluna "c".....	105
Figura 6.13	Influência do pH da fase móvel na separação de espécies hidrolíticas de Cr(III).....	106
Figura 6.14	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1a e perclorato de cálcio como eluyente.....	110
Figura 6.15	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1a e perclorato de lantânio como eluyente.....	111
Figura 6.16	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1b .....	113
Figura 6.17	Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2a e perclorato de cálcio	

como eluente.....	114
Figura 6.18 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2a e perclorato de lantânio como eluente.....	115
Figura 6.19 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2b e perclorato de lantânio como eluente.....	116
Figura 6.20 Radiocromatograma de uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III), marcadas com $^{51}\text{Cr}$ .....	118
Figura 6.21 Eficiência das colunas 1a e 2b, recheadas com Partisil 10SCX, partículas de 10 $\mu\text{m}$ .....	119
Figura 6.22 Estudo da estabilidade de amostras contendo espécies hidrolíticas de Cr(III).....	123
Figura 6.23 Estudo da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III).....	125
Figura 6.24 Variação da concentração relativa do dímero (ln D) da amostra D <sub>5</sub> , em função do tempo de estocagem.....	127
Figura 6.25 Espectro de absorção no visível das espécies hidrolíticas de Cr(III).....	129
Figura 6.26 Espectro de absorção no visível do monômero (a) e dímero (b).....	130
Figura 6.27 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método do nitrato de cálcio e colunas de maior altura.....	135

## RESUMO

# DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A SEPARAÇÃO DE ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III)

Pierina Sueli Bonato

Orientador: Kenneth E. Collins

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal = 6154 - 13081 Campinas -SP - Brasil

Tese de Doutorado - 1986

A hidrólise de  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  fornece espécies poliméricas com carga elevada, para as quais não existe, na literatura, métodos adequados para análise de rotina. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos cromatográficos para serem utilizados na separação destas espécies.

O primeiro método emprega resina AG 50W X-4, partículas com diâmetro de 38-75  $\mu\text{m}$ , e soluções de nitrato de cálcio e nitrato de lantânio, para a separação de 5 picos. Este método é simples, de baixo custo, podendo ser empregado em laboratórios sem sofisticação.

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  $\mu\text{m}$ , 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.

No terceiro método utiliza-se colunas de diâmetro interno reduzido (2 mm) 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 diminuição do diâmetro interno implica em uma redução no custo operacional.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR THE  
SEPARATION OF HYDROLYTIC SPECIES OF Cr(III)

Pierina Suelli Bonato

Advisor: Kenneth E. Collins

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal = 6154 - 13081 Campinas - SP - Brasil

Doctorate thesis - 1986

The hydrolysis of  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  yields polymeric species, with high charge, for which there are no satisfactory methods for their routine analysis in the literature. The present work describes the development of three chromatographic methods which may be used for the routine separation of these species.

The first method uses Bio-Rad AG 50W X-4 cation exchange resin (38 - 75  $\mu\text{m}$  particle diameter) with solutions of calcium nitrate and lanthanum nitrate as eluents. Five peaks have been separated by this method. The method is simple, cheap and can be used in laboratories with minimal chromatographic equipment.

The second is a HPLC method which uses a 4.6 x 200 mm column packed with Partisil 10SCX, particles of 10  $\mu\text{m}$ , and calcium nitrate solutions for elution of five peaks. This method is fast and has good resolution, but requires the availability of expensive equipment and stationary phases.

The third method uses columns of 2 mm internal diameter, packed with the same stationary phase used in the second method. Solutions of calcium perchlorate and lanthanum perchlorate were used to separate four peaks. The only obvious advantage of the reduced diameter columns for separation of Cr(III) species is a reduction of operational cost.

## CAPÍTULO 1

## ESPÉCIES HIDROLÍTICAS DE Cr(III)

## 1.1 Introdução

A hidrólise de cátions é bastante importante na separação de íons metálicos, através da precipitação de hidróxidos, no estudo do efeito de íons metálicos em organismos vivos, ou ainda, no estudo de sistemas onde estes cátions estão presentes em pequenas concentrações, como por exemplo, em águas naturais. Neste último caso, reações de hidrólise afetam a adsorção do metal na superfície do material particulado, a solubilidade de óxidos e hidróxidos do metal e a oxidação ou redução a outros estados de valência (1).

Sendo assim, as reações de hidrólise têm sido grande objeto de estudo; no entanto, torna-se difícil a determinação da identidade e estabilidade dos produtos de hidrólise, devido à formação de hidróxidos complexos polinucleares e também porque a faixa de pH em que se pode estudar estes produtos é limitada pela precipitação de óxidos ou hidróxidos do cátion. Outra complicação no estudo de reações hidrolíticas de cátions é a rápida interconversão das espécies formadas, em alguns sistemas, o que torna difícil a aplicação de métodos adequados para a determinação de suas estruturas, constantes de hidrólise, etc. (2).

Optou-se pelo estudo dos produtos hidrolíticos de Cr(III), pois neste caso, tem-se espécies estáveis por períodos de tempo que possibilitam a aplicação de uma variedade de técnicas de análise. Dados sobre os produtos de hidrólise de Cr(III)

poderão servir para esclarecer dúvidas sobre outros sistemas com maiores dificuldades de estudo. Além disso, informações obtidas neste trabalho serão empregadas em outros que estão sendo desenvolvidos neste laboratório, como por exemplo, dopagem de cromatos sólidos, cinética das reações de espécies hidrolíticas de Cr(III), recozimento de sólidos contendo várias espécies de cromo, etc.

O estudo destas espécies hidrolíticas requer métodos adequados de separação, já que não é possível, até o presente, sintetizá-las de forma pura; obtém-se sempre uma solução contendo uma mistura das espécies. Este trabalho teve como ênfase maior o desenvolvimento de métodos cromatográficos para a separação destas espécies, visto que, na literatura, a grande maioria dos trabalhos trata apenas da separação de Cr(III) e Cr(VI) (3-9). Somente a partir de 1959 começou-se a desenvolver métodos de separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), apesar de vários trabalhos, desde o início do século, sugerirem a formação de espécies poliméricas para explicar medidas de concentração de íons  $H^+$  (10-13) e dados sobre o abaixamento do ponto de congelamento de soluções de nitrato de cromo (14).

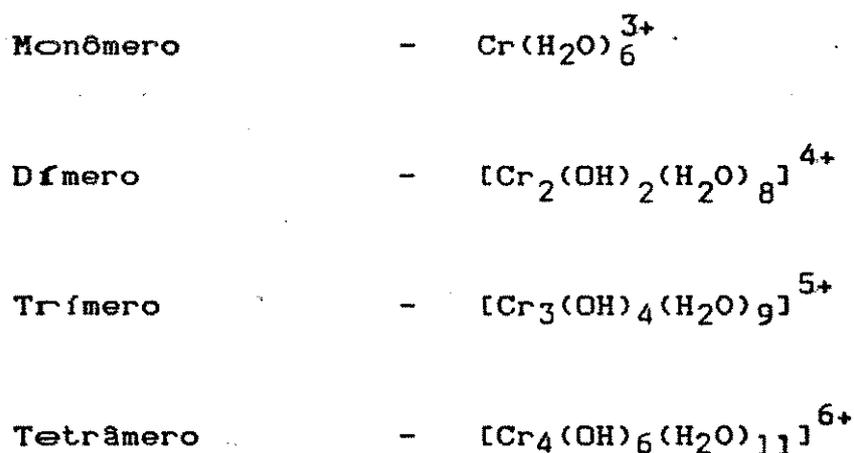
## 1.2 Preparação de espécies hidrolíticas de Cr(III)

A hidrólise e polimerização de íons metálicos em solução aquosa ocorre naturalmente, no entanto, a quantidade de produtos formados é muito pequena; há necessidade de procedimentos adequados para preparar quantidades suficientes destas espécies, para poderem ser detectadas pelos métodos de análise.

A obtenção de espécies hidrolíticas de Cr(III) é feita a partir de sais de cromo (III) (nitrato, cloreto, sulfato e per-

clorato) através de refluxo, adição de hidróxidos, ou através da oxidação de Cr(II). Estas espécies também podem ser obtidas por meio da dissolução de cromatos irradiados com nêutrons; neste caso, obtêm-se espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ . A utilização de nitrato e perclorato de cromo é preferível, já que não há indicação da formação de complexos de substituição de água, pelo ânion correspondente, na esfera de coordenação do cátion (13,15). Íons do tipo  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_5\text{Cl}^{2+}$  e  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2^+$  (16) e análogos para série de sulfato (17) são bastante conhecidos.

Uma solução de um destes sais de Cr(III) quando refluxada leva a formação de uma mistura de espécies poliméricas constituídas de átomos de cromo ligados por pontes "OH" e carga positiva elevada. A espécie de partida, com um único átomo de cromo e carga 3+ é denominada monômero. Dímero e trímero são espécies com 2 e 3 átomos de cromo e carga 4+ e 5+, respectivamente. Tetrâmero é a espécie com 4 átomos de cromo e carga 6+. As fórmulas são indicadas abaixo (18):



A medida em que aumenta o grau de polimerização ocorre um aumento na carga positiva da espécie. As estruturas propostas serão discutidas posteriormente.

Laswick e Plane (19) verificaram que com o refluxo de

uma solução de perclorato de cromo havia uma diminuição na quantidade de monômero com uma conseqüente formação de dímero e trímero. Após cerca de uma hora de refluxo a quantidade de dímero chegou a um máximo, enquanto que, para obter-se um máximo da 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. Os métodos empregados para a separação das espécies neste trabalho e em outros serão discutidos posteriormente.

Thompson (2,20) e Finholt (21,22) também empregaram o refluxo de soluções de perclorato e nitrato de cromo para obtenção destas espécies hidrolíticas.

Mais recentemente, Stunzi (18,23) preparou misturas de espécies hidrolíticas de Cr(III) através da adição de 1 equivalente de hidróxido de sódio à solução do monômero, sem necessidade de refluxo.

Schaal e Faucherre (12) sugeriram a seguinte reação para explicar a formação da espécie dimérica após alcalinização de soluções de nitrato de cromo:



Outra maneira de preparação de espécies hidrolíticas de Cr(III), e neste caso, tendo-se uma predominância da espécie dimérica, é através da oxidação do Cr(II) a Cr(III) por oxigênio.

O Cr(II) pode ser obtido a partir de soluções de sais de Cr(III) através de redução eletrolítica (24-26), ou utilizando o redutor de Jones (2,20,21,27), ou ainda, através da redução de Cr(VI) empregando o mesmo redutor de Jones (28,29). O redutor de Jones consta em zinco amalgamado com cloreto de mercúrio (II) em

meio ácido (30-33). A finalidade do mercúrio na 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 facilmente oxidado a Cr(III) pelo oxigênio (31):



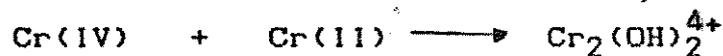
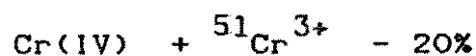
O Cr(III) formado no processo de oxidação encontra-se principalmente na forma dimérica; a porcentagem desta espécie depende de diversos fatores, como por exemplo, porcentagem de mercúrio na amálgama, pureza do zinco, tamanho das partículas de zinco, etc.

O mecanismo de formação do dímero a partir da oxidação de Cr(II) tem sido motivo de bastante estudo, empregando-se vários agentes oxidantes:  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{HClO}$ ,  $\text{HClO}_3$  (24),  $\text{Pb(IV)}$  (34) e  $\text{Cr(VI)}$  (35).

Os mecanismos propostos sugerem a formação do intermediário Cr(IV) que então reage com Cr(II) formando o dímero (24).



Hegedus e Halm (35) usando espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  sugerem uma modificação do mecanismo acima, empregando Cr(VI) como agente oxidante, para explicar a distribuição de radioatividade nos produtos formados:



Nota - Nas fórmulas do dímero não foram consideradas as moléculas de água.

Espécies hidrolíticas de Cr(III) também foram obtidas a partir da dissolução de cromatos irradiados com nêutrons (37-41).

Adams e colaboradores (42) obtiveram espécies dimérica e trímica em experimentos de redução de cromatos com peróxido de hidrogênio em meio ácido (ácido perclórico). O dímero também foi obtido por Ardon e Bleicher (43) empregando a redução de Cr(VI) com peróxido de hidrogênio.

### 1.3 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III)

Espécies hidrolíticas de Cr(III) possuem carga positiva, e portanto, podem ser separadas empregando-se cromatografia por troca iônica. Na verdade, todos os métodos citados na literatura empregam este tipo de cromatografia.

A primeira separação foi obtida por Laswick e Plane

(19) em soluções de perclorato de cromo submetida a refluxo, empregando resina de troca catiônica. A espécie com um átomo de cromo (monômero) foi eluída com ácido perclórico 1 mol/l; perclorato de lantânio 0.02 e 0.2 mol/l em  $\text{pH} = 2$  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 à coloração verde remanescente no topo da coluna, após o término da análise.

Ardon e Plane (24) empregando o mesmo método de análise separaram os produtos da oxidação de soluções de  $\text{Cr(II)}$  com oxigênio, verificando que a espécie produzida por este método tinha o mesmo comportamento cromatográfico que a segunda espécie eluída por Laswick e Plane.

Finholt (21,22) desenvolveu dois métodos cromatográficos para a separação de espécies obtidas a partir do refluxo de soluções de nitrato ou perclorato de cromo, ou a partir da oxidação de  $\text{Cr(II)}$ .

O primeiro método consta na eluição das espécies com perclorato de bário 0.5 mol/l em ácido perclórico 2 mol/l. Quando utilizou resina com partículas pequenas (denominada coloidal) verificou a separação de 5 bandas; no entanto, o emprego de resina com partículas maiores (63-150  $\mu\text{m}$ ) resultou na separação de três espécies e novamente observou a retenção de espécies poliméricas no topo da coluna.

Este tipo de cromatografia tem a desvantagem de fornecer as espécies em uma solução do eluente, o que muitas vezes, pode interferir nos métodos analíticos utilizados posteriormente. Para evitar este problema, Finholt 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 sempre contaminada com a primeira ou terceira banda.

Thompson (2,20) também empregou deslocamento com perclorato de tório ou eluição com perclorato de cálcio para a separação de três espécies denominadas como sendo o monômero, dímero e trîmero.

Ácido perclórico 2 mol/l e 5 mol/l foi utilizado por Adams e colaboradores (42) para separar três espécies obtidas da reação de Cr(VI) com peróxido de hidrogênio, em colunas recheadas com resina de partículas de 75 a 180  $\mu m$ ; as separações foram efetuadas a 0°C. Além destas espécies de Cr(III) separaram também Cr(VI) com ácido perclórico 0.1 mol/l.

Em outro procedimento empregou-se ácido perclórico 4 mol/l para eluição do monômero e ácido clorídrico 5 mol/l para eluição do dímero (37,38). Aqui também, as espécies poliméricas ficam retidas pela resina. Este método foi extensivamente utilizado nos últimos anos em estudos de cromatos irradiados com nêutrons e dopagens com  $^{51}Cr$  (38-40,44).

Mais recentemente, Stunzi (18,23) separou seis espécies empregando Sephadex SPC-25 e soluções de perclorato de sódio e lítio como eluentes. Este tipo de fase estacionária retém as espécies mais fracamente, e portanto, torna-se mais fácil eluí-las.

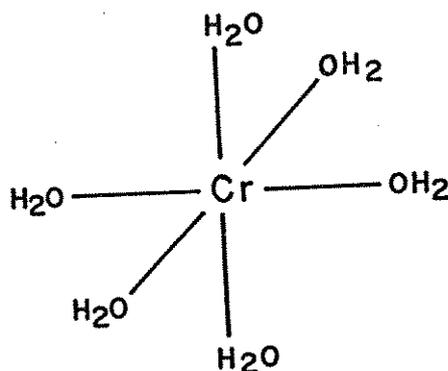
Estes métodos cromatográficos citados na literatura explicam porque pouca informação é disponível sobre espécies com maior grau de polimerização. Somente em 1983 surgiu um método capaz de separar espécies com grau de polimerização maior que três

(18). Além disso, as informações sobre o método de separação neste trabalho não são muito claras, tornando difícil sua reprodução.

#### 1.4 Determinação da estrutura das espécies hidrolíticas de Cr(III)

O monômero possui estrutura octaédrica com seis moléculas de água na esfera de coordenação (45,46), como indicado na figura abaixo:

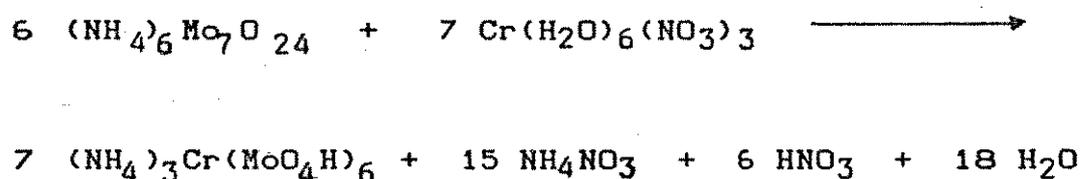
3 +



Este monômero sofre reações de hidrólise formando espécies poliméricas de carga elevada. A estrutura destas espécies tem sido motivo de muito estudo, no entanto, até recentemente, apenas a estrutura do dímero e trímero haviam sido determinadas, devido a falta de métodos de separação adequados.

Hall e Eyring (13) sugeriram a formação de dímero e trímero 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 (45). Esta substância reage apenas nas posições onde há água como ligante; ligações que for-

mas pontes entre os átomos de cromo são deixadas intactas. Assim, o número de pontes de oxigênio entre átomos de cromo pode ser determinado, como por exemplo, no caso de nitrato de cromo:



A condutância aumenta até a relação Mo/Cr ser igual a 6/1 devido a um aumento na concentração de íons  $\text{H}^+$ . Quando atinge-se o ponto final o excesso do titulante reage com os íons  $\text{H}^+$  causando uma diminuição na condutância da solução.

Neste trabalho a titulação foi efetuada na mistura e não nas espécies separadas. Laswick e Plane (19) e Finholt (21) empregaram este método para determinar a relação Mo/Cr das duas espécies separadas por cromatografia, chegando a conclusão de que possuíam 2 e 3 átomos de cromo.

O grau de polimerização também foi determinado empregando medidas crioscópicas. Adicionando-se um soluto a um dado solvente ocorre o abaixamento do ponto de congelamento desse solvente puro, que depende apenas do número de partículas. Assim, para uma determinada concentração de cromo o dímero irá provocar um abaixamento do ponto de congelamento igual à metade daquele provocado pelo monômero.

Thompson (2,20), Finholt (21) e Ardon e Linenberg (25) determinaram o grau de polimerização para as espécies separadas por cromatografia. A partir dos 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 foi proposta como sendo um

trímero.

Finholt (21,22) determinou o número de hidróxidos por átomo de cromo segundo o método descrito a seguir: a solução era analisada para verificação da concentração de íons  $H^+$  livres e de cromo (oxidação com peróxido de hidrogênio em presença de hidróxido de sódio). O conteúdo de álcali foi determinado por titulação com ácido clorídrico e determinou-se o número de hidróxidos por átomo de cromo ( $OH^-/Cr$ ) através da fórmula:

$$OH^-/Cr = \frac{4C + H_1 + H_2 - B}{C}$$

sendo: C = número de átomosgrama de cromo

$H_1$  = número de equivalentes do ácido usado na titulação

$H_2$  = número de equivalentes de H livres inicialmente

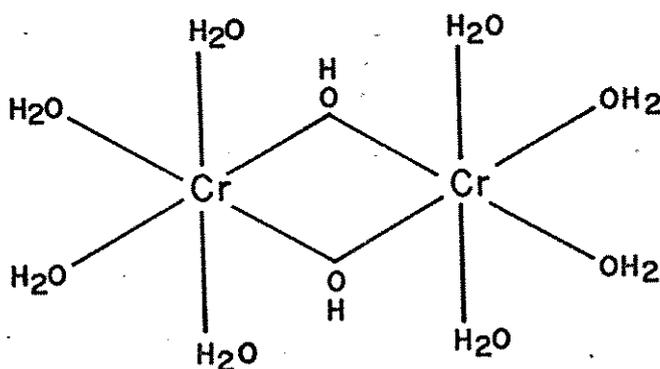
B = número de equivalentes da base adicionada

Utilizando dois métodos desenvolvidos por Cady e Connick (49,50), Finholt (21,22) determinou a carga por átomo de cromo e a carga por espécie das duas espécies separadas por cromatografia. Os resultados foram inferiores aos esperados (carga 4+ para o dímero e 5+ para o trímero), e foram explicados como sendo devido a uma complexação com perclorato, na resina utilizada na determinação da carga por átomo de cromo e carga por espécie, apesar da não evidência de complexação de Cr(III) em soluções de perclorato.

A partir dos resultados destes experimentos, o dímero tem sido proposto como tendo uma ponte "O" ou duas pontes "OH" ligando os dois átomos de cromo, sendo a carga final, nos dois

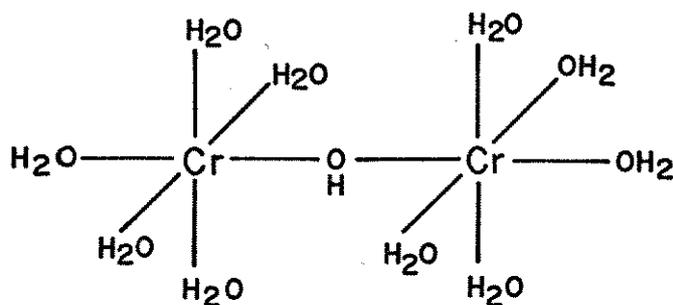
casos, igual a 4+. Através de estudos empregando  $^{18}\text{O}$  (26) verificou-se que na verdade o dímero possui 2 pontes "OH" como indicado na seguinte estrutura:

4 +



Thompson (2) e Stunzi (18) relataram a reação de decomposição do dímero em presença de ácidos formando um intermediário com uma única ponte "OH".

5 +

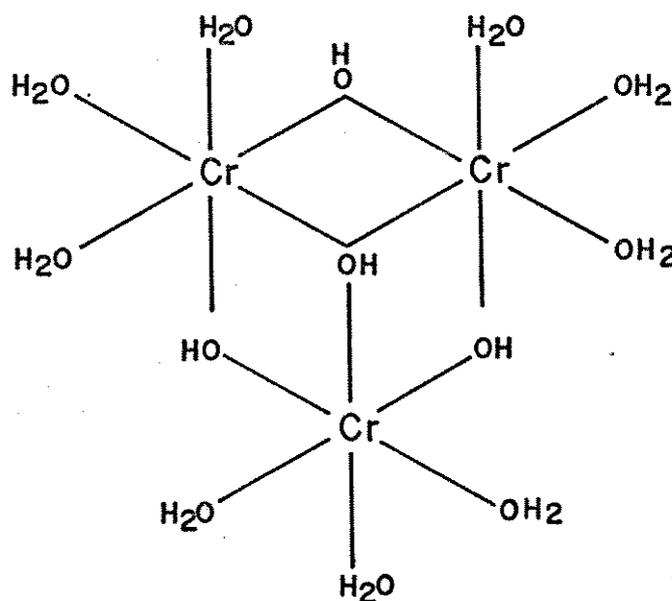


A reação de decomposição do dímero com 2 pontes "OH" para o intermediário com uma única ponte é rápida ( $t_{1/2} = 23$  minutos em ácido perclórico 1 mol/l a 25 °C). Este intermediário pode sofrer uma nova etapa de decomposição resultando em monômero ( $t_{1/2} = 6$  dias em ácido perclórico 2-6 mol/l a 25°C) (2).

Foram propostas duas estruturas para o trímero, baseadas nos experimentos já relatados, e através de medidas de suscetibilidade magnética e de ressonância paramagnética eletrônica (2,20,22).

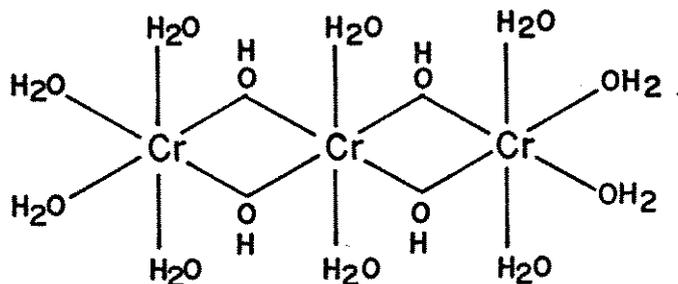
5 +

(a)



5 +

(b)



Através de medidas de pKa, Stunzi (18) verificou que o dímero é mais ácido que o trímero como pode-se verificar na Tabela 1.1

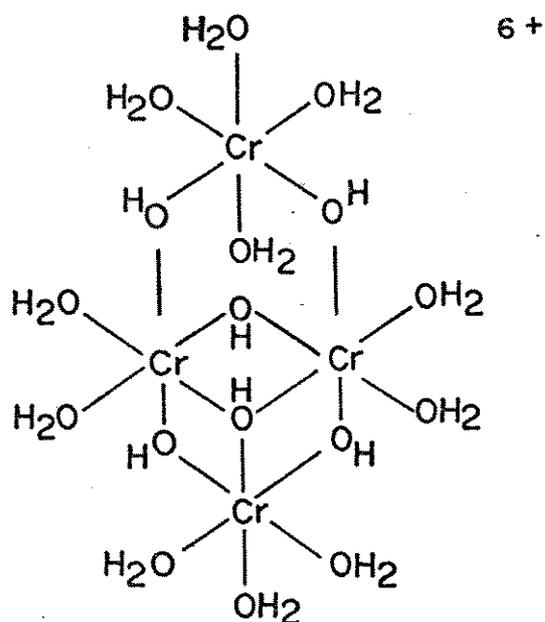
Tabela 1.1 Valores de pKa para as espécies hidrolíticas de Cr(III).

monômero	dímero	trímero	tetrâmero
4.29	3,68	4.35	2.55
6.1	6.04	5.63	5.08
		6.0	

O primeiro pKa do dímero é menor que o do monômero indicando uma maior acidez devido à maior carga e também devido à presença de água coordenada em posição trans a outra água, o que confere maior acidez (51,52). Se a estrutura do trímero fosse linear ele apresentaria maior acidez que o dímero, pois neste caso, teria três fragmentos que conferem maior acidez. A estrutura "a" explica a menor acidez do trímero.

A maior estabilidade do trímero em meio ácido ( $t_{1/2} = 21$  dias em ácido perclórico 1 mol/l a 25°C (22)) também confirma a estrutura "a".

Apenas recentemente obteve-se sucesso na separação do tetrâmero, e portanto, muito pouco foi feito para a elucidação de sua estrutura. De acordo com os valores de pKa na Tabela 1.1, estabilidade em ácido perclórico e dados sobre quebra e síntese de tetrâmero marcado com  $^{51}\text{Cr}$ , Stunzi (18,23) sugere a seguinte estrutura:



A obtenção de espectros de absorção no visível também foi empregado em vários trabalhos (2,18-22,48,53), no entanto, todos os produtos de hidrólise apresentam picos de absorção bastante próximos, e portanto, torna-se difícil diferenciá-los.

Tabela 1.2 Valores de  $\lambda_{\max}$  e  $\mathcal{E}$  para as espécies hidrolíticas de Cr(III) (18).

espécie	$\lambda_{\max}$	$\mathcal{E}$ ( $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ 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
tetramero	580	15.6
	426	30.3
hexâmero	585	18.6
	426	29.0

O espectro de absorção destas espécies está relacionado com transições d-d no metal, que são proibidas pelas regras de mecânica quântica, e portanto, os valores de  $\mathcal{E}$  são baixos (54).

A comparação entre os espectros de absorção pode ser feita de maneira mais segura usando a relação entre os valores de  $\mathcal{E}$  para dois comprimentos de onda (18). Assim, para o monômero tem-se:

$$\frac{\mathcal{E}_{\max} \text{ 420 nm}}{\mathcal{E}_{\max} \text{ 580 nm}} = 1.17 \pm 0.01$$

Os valores encontrados para as outras espécies, nos

mesmos comprimentos de onda são: dímero =  $1.18 \pm 0.01$ , trímero =  $1.6 \pm 0.01$ , tetramero =  $1.95 \pm 0.04$ , pentâmero = 1,5 e hexâmero = 1,56.

Nesta revisão um ponto ficou bastante claro, a necessidade de métodos adequados para separação destas espécies, tornando possível maiores estudos.

## CAPÍTULO 2

## CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

## 2.1 Introdução

A cromatografia é uma técnica de separação, quantificação e identificação dos componentes de uma amostra, sendo que no caso de identificação, ela não é totalmente confiável. Neste capítulo será considerada apenas a cromatografia líquida em coluna, já que foi este o tipo de cromatografia empregado neste trabalho.

Na cromatografia líquida em coluna a fase estacionária está contida em um tubo de vidro ou de aço inox; a fase móvel é um líquido que percola através da coluna arrastando os componentes da amostra, depositada no topo da coluna, com velocidades diferentes, ocorrendo assim, a separação.

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

Na cromatografia por adsorção a fase estacionária é um sólido de alta área superficial (maior que  $200 \text{ m}^2/\text{g}$ ), como por exemplo, sílica ou alumina. Este sólido retém a amostra seletivamente devido à competição entre as moléculas da amostra e as da fase móvel pelos sítios ativos da fase estacionária. Este tipo de cromatografia é empregado para a separação de compostos não iônicos, de peso molecular intermediário (200 a 2000) solúveis em solventes orgânicos, como por exemplo, antioxidantes, vitaminas,

esteróides, alcalóides, lipídeos, etc. (56).

Na cromatografia por partição tem-se uma fase estacionária líquida, insolúvel na fase móvel, recobrando partículas de um suporte, geralmente, sílica. A separação dos constituintes da amostra baseia-se na partição destes solutos entre as duas fases líquidas; o componente mais solúvel na fase móvel será eluído mais rapidamente, enquanto que, o mais solúvel na fase estacionária será retido por um tempo maior. A fase estacionária pode ser polar, e neste caso, tem-se a cromatografia com fase normal, utilizada para a separação de pesticidas, esteróides, alcalóides, fenóis, complexos metálicos, etc.; quando a fase estacionária é apolar tem-se a cromatografia com fase reversa, empregada para a separação de antraquinonas, antibióticos, vitaminas, esteróides, alcalóides, etc. (56).

A grande desvantagem da cromatografia por partição, que tem limitado seu uso, é a possibilidade de solubilização da fase estacionária na fase móvel, durante a utilização da coluna. Este inconveniente foi resolvido através da utilização de fases estacionárias ligadas quimicamente a um suporte sólido (sílica), na chamada cromatografia com fase quimicamente ligada. Substâncias polares ou apolares podem ser ligadas à sílica através de ligações  $\text{-Si-O-Si-C-}$ ; este material é hidrolítica e termicamente estável podendo ser usado na faixa de pH de 2 a 8.5 e em temperaturas de até 80 °C (57).

A cromatografia por exclusão é uma técnica predominantemente usada para a separação de compostos de alto peso molecular (maior que 2000), incluindo polímeros orgânicos (poliolefinas, poliestireno, poliamidas), silicones e biopolímeros (proteínas, ácidos nucleicos, oligossacarídeos, etc.) (56). A fase estacionária é constituída de partículas contendo poros de diâmetro

definido; compostos que conseguem entrar nestes poros, devido ao tamanho da molécula, ficam retidos por um tempo maior.

A cromatografia por troca iônica foi empregada neste trabalho para a separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), e portanto, será discutida com maiores detalhes nos itens seguintes.

## 2.2 Cromatografia por troca iônica

A cromatografia por troca iônica é utilizada na análise de compostos iônicos ou ionizáveis, especialmente em aplicações 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, estes compostos podem ser separados através de cromatografia por troca iônica, escolhendo-se um pH adequado para a fase móvel, onde estes compostos se encontram na forma ionizada. Outros compostos que podem ser separados por este tipo de cromatografia, incluem ácidos carboxílicos, açúcares, cátions e ânions inorgânicos, etc.

Na cromatografia por troca iônica a fase estacionária possui grupos carregados positiva ou negativamente, que retêm espécies de carga contrária. Um trocador catiônico possui grupos com carga negativa que retêm seletivamente espécies catiônicas; um trocador aniônico possui grupos carregados positivamente que retêm espécies com carga negativa. A figura 2.1 mostra o que ocorre no processo de troca iônica.

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 as moléculas da

amostra e o contra-íon, também presente na fase móvel, pelos sítios carregados da fase estacionária.

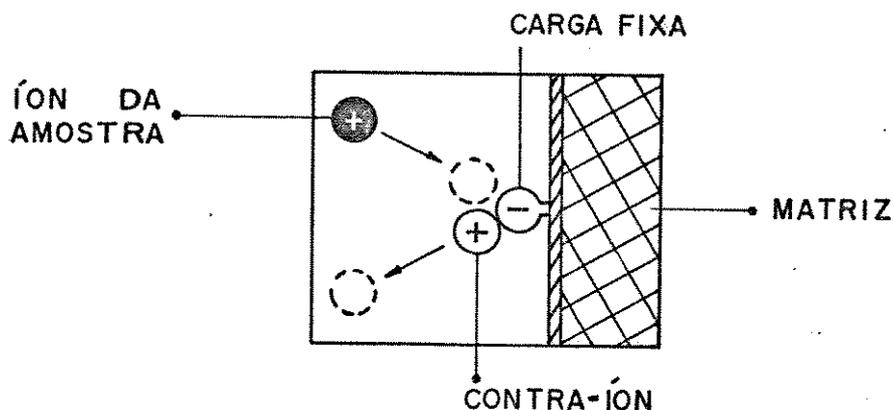


Figura 2.1 Esquema do processo de troca iônica em um trocador catiônico (58).

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

#### Trocador catiônico



onde:  $M^+$  = cátion

R = matriz do trocador

#### Trocador aniônico



onde:  $X^-$  = ânion

R' = radical orgânico

O coeficiente de distribuição, no caso do trocador catiônico, é representado por:

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

Este coeficiente de distribuição é função de alguns parâmetros experimentais, como pH, ralo iônico, porosidade das partículas que compõem a fase estacionária, força iônica, temperatura, etc.

A cromatografia por troca iônica, bem como os outros tipos de cromatografia líquida em coluna, pode ser classificada em cromatografia clássica e cromatografia líquida de alta eficiência. A diferença entre estes dois tipos de cromatografia em coluna está no tamanho das partículas que constituem a fase estacionária. No primeiro caso emprega-se partículas maiores que 40  $\mu\text{m}$ ; a ação da gravidade é suficiente para ter-se vazões razoáveis da fase móvel. No caso de cromatografia líquida de alta eficiência emprega-se partículas de menor diâmetro (5, 10  $\mu\text{m}$ ), com a finalidade de aumentar a eficiência das colunas, o que acarreta em uma maior resistência ao fluxo, tornando necessário o emprego de bombas de alta pressão para impulsionar a fase móvel através da coluna.

### 2.2.1 Cromatografia por troca iônica clássica

Os materiais mais utilizados para cromatografia por troca iônica clássica são polímeros sintéticos orgânicos, mais comumente denominados como resinas, capazes de trocar íons (59).

Este material é composto de uma matriz orgânica porosa, onde encontram-se ligados grupos ionizáveis (ácidos ou básicos).

Estas resinas são obtidas através da polimerização do estireno em presença de divinilbenzeno (60), resultando em uma estrutura tridimensional, elástica, onde pode-se ligar os grupos com carga positiva (clorometilação do anel benzênico seguido de reação com aminas terciárias) ou com carga negativa (sulfonação). Estes materiais são conhecidos como resina aniônica fortemente básica e resina catiônica fortemente ácida, respectivamente.

Resinas aniônicas fracamente básicas são obtidas através da reação de aminas primárias e secundárias com a matriz orgânica clorometilada, enquanto que resinas catiônicas fracamente ácidas são obtidas através da copolimerização do ácido metacrílico e divinilbenzeno.

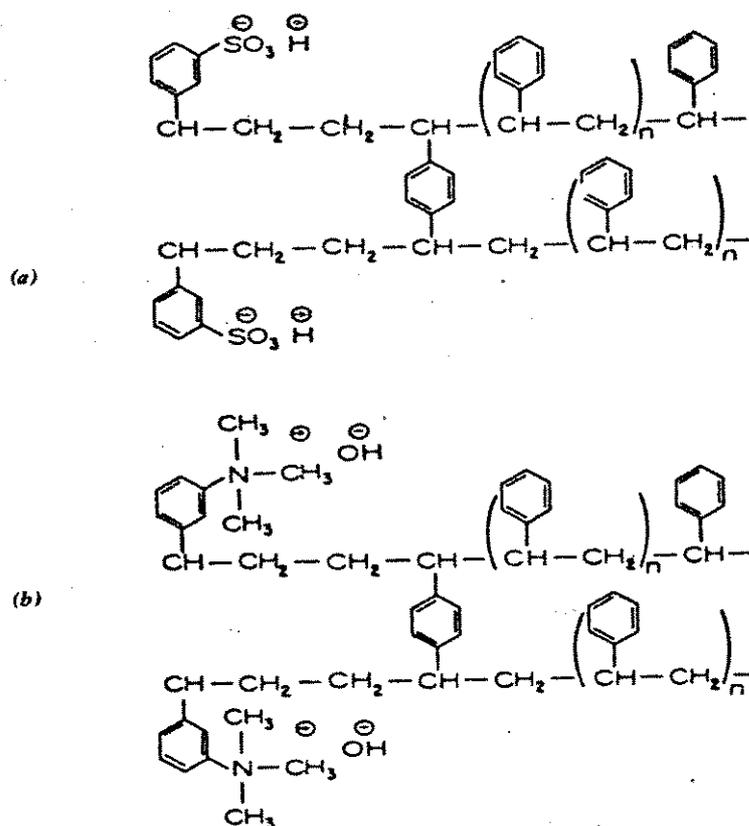


Figura 2.2 Estrutura de resinas de troca catiônica (a) e aniônica (b).

Estas resinas são estáveis em soluções ácidas e básicas; podem ser empregadas em presença de agentes redutores, bem como, em concentrações moderadas de agentes oxidantes, como por exemplo, ácido nítrico 2-3 mol/l, a temperatura ambiente. A maioria destas resinas podem ser empregadas a temperaturas de 100 °C (59).

### 2.2.1.1 Propriedades físicas das resinas

#### a- Tamanho e forma das partículas.

Para propósitos cromatográficos emprega-se partículas esféricas de 106 a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, ou menores. O diâmetro de partícula das resinas, normalmente é dado em mesh; a transformação para  $\mu\text{m}$  foi feita utilizando o catálogo de Bio-Rad Laboratories de 1979 (61).

#### b- Entumescimento e porosidade

Quando uma resina é colocada em presença de uma solução aquosa, ela embebe água, devido à tendência dos grupos funcionais a se hidratarem, formando uma estrutura porosa.

Este entumescimento, medido em massa de água por miliequivalentes de resina, é diretamente proporcional ao número de grupos funcionais hidrofílicos ligados à matriz polimérica. Depende também, da natureza do solvente, presença ou ausência de eletrólitos na solução, sua natureza e concentração, natureza do íon fixo e contra-íon, do esqueleto da resina e do grau de entrecruzamento (62).

O grau de entrecruzamento está relacionado com a rigidez da resina e com o tamanho dos poros; quanto maior for o grau de entrecruzamento, expresso em porcentagem de divinilbenzeno empregado na copolimerização do estireno, menor serão os poros das partículas e estas apresentarão uma maior rigidez mecânica (59).

Schwachula e Lukas (63) prepararam resinas com maior rigidez mecânica empregando bis-4-vinilfenil-metano para efetuar o entrecruzamento do estireno.

#### 2.2.1.2 Propriedades químicas das resinas

##### a- Capacidade de troca

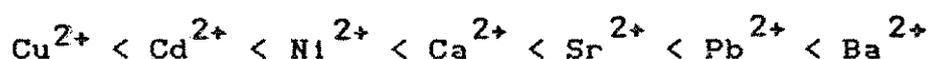
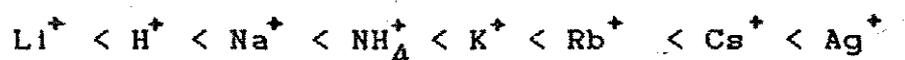
A capacidade de troca é definida como o número de sítios de troca da matriz da resina (equivalentes) por peso do material. Estes valores estão na faixa de 3-5 meq/grama de resina (57). A capacidade de resinas fortemente ácidas ou básicas é independente do pH da fase móvel, equanto que, em resinas fracamente ácidas ou básicas o pH influencia bastante na capacidade de troca.

Resina catiônica fracamente ácida tem sua capacidade bastante diminuída em pH abaixo de 4, devido a grande afinidade da resina pelos íons  $H^+$  presentes na fase móvel. No caso de resinas aniônicas fracamente básicas, a capacidade diminui em pH acima de 7.

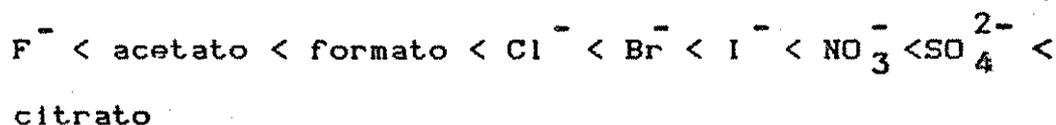
##### b- Seletividade

A seletividade depende principalmente de dois fato-

res: carga iônica e raio iônico dos íons hidratados. Íons divalentes são mais atraídos pela resina que íons monovalentes. Diferentes íons de mesma carga terão afinidades inversamente proporcional a seus raios iônicos hidratados. Assim, a afinidade da resina por cátions monovalentes e divalentes é a seguinte:



Para ânions a seletividade varia de acordo com o tipo de resina estudado. Para propósitos gerais pode-se considerar a seguinte ordem de afinidade:



A seletividade também varia com o grau de entrecruzamento (64). Para cátions monovalentes, quanto maior o grau de entrecruzamento maior a seletividade, isto é, a diferença entre os coeficientes de partição para os dois íons analisados é maior (65).

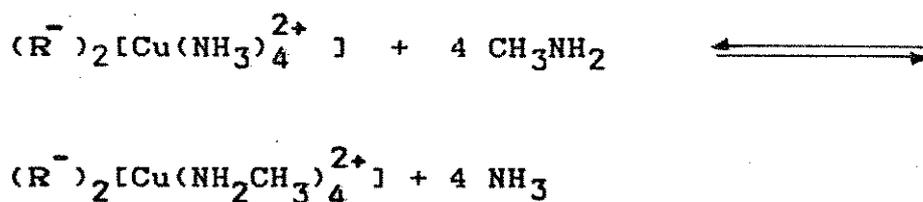
Outros fatores que também podem influenciar na seletividade são: íons orgânicos interagem com a resina através de interações eletrostáticas e através de interações de Van der Waals, devido à cadeia orgânica; íons que possuem sua carga diminuída devido a formação de complexos com íons presentes na fase mó-

vel, serão retidos com menor intensidade.

### 2.2.1.3 Outros tipos de cromatografia empregando resinas de troca iônica

Além do mecanismo baseado na competição entre íons da amostra e da fase móvel pelos sítios carregados da fase estacionária, existem outros mecanismos de separação quando se emprega resinas de troca iônica. Baseados nestes mecanismos tem-se a cromatografia por troca de ligantes, a cromatografia por partição-exclusão de íons e a cromatografia por ajuste da força iônica.

Na cromatografia por troca de ligantes emprega-se trocadores catiônicos contendo contra-íons como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Ag}^+$ . Moléculas de amônia, aminas, aminoácidos, etc. atuam como ligantes para o cátion metálico, que apesar de ligado à resina ainda conserva suas características de átomo de coordenação; estes ligantes podem ser trocados por ligantes diferentes como indica a equação abaixo:



onde R representa o esqueleto da resina.

Diferentes ligantes têm diferentes afinidades pelo metal ligado ao trocador, sendo assim, suas velocidades de migração pela coluna serão diferentes, ocorrendo a separação (59).

Baseando-se no mecanismo da cromatografia por partição-exclusão de íons pode-se separar compostos não iônicos empregando

resinas de troca iônica. A resina possui uma estrutura porosa, por onde os íons podem penetrar e interagir com os grupos carregados mais internos. Íons de carga contrária à carga da resina penetram nestes poros e são atraídos pelos sítios ativos; íons de mesma carga são repelidos pelos sítios ativos da resina e são excluídos dos poros. No caso de uma resina de troca catiônica, em presença de uma solução de cloreto de sódio, os íons cloreto serão excluídos dos poros devido à repulsão eletrostática com os sítios carregados negativamente da resina (59). Isto não acontece com espécies não iônicas que entram nos poros e sofrem um processo de partição entre a água ocluída na resina e a água presente entre as partículas (fase móvel) (67). Estes solutos não iônicos sofrem também, atrações polares pelo grupo funcional da resina e interações devido a forças de Van der Waals com o esqueleto da resina.

Na cromatografia por ajuste da força iônica tem-se um incremento na separação de substâncias não iônicas como álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, hidrocarbonetos aromáticos, etc. por meio da adição de sais à fase móvel. Quando se emprega somente água como fase móvel, esta solvata os sítios ativos da resina; a adição de um sal faz com que, parte da água retida na resina saia para solvatar os íons adicionados, deixando os grupos carregados da resina expostos, possíveis de serem solvatados pelas moléculas da amostra (59).

#### 2.2.1.4 Outros materiais empregados em cromatografia por troca iônica clássica

Além desses materiais baseados nos polímeros do estireno-divinilbenzeno existem outros empregados em cromatografia por

troca iônica clássica, como por exemplo, celulose, dextrana, gel de acrilamida e trocadores inorgânicos.

A celulose é constituída de cadeias glicosídicas em vários estados de ordem e desordem, orientadas aleatoriamente ao longo de um eixo. As cadeias de maior orientação são descritas como áreas fibrilares cristalinas e são conectadas por fibras longas axiais compostas de cadeias glicosídicas pouco ordenadas. Pontes de hidrogênio entre cadeias vizinhas e entre áreas fibrilares conferem estabilidade dimensional para a matriz de celulose e a torna insolúvel em água (59).

Quando grupos ionizáveis são introduzidos nesta matriz, o polímero de celulose torna-se um trocador catiônico ou aniônico (66).

A matriz de celulose pode ser modificada por hidrólise ácida e posterior entrecruzamentos com reagentes bifuncionais, para reduzir a tendência da matriz em embeber água. Este material, chamado de celulose microgranular, é composto de partículas mais densas e esféricas e também, apresenta maior capacidade de troca (em alguns casos, acima de 5 meq/g) que aqueles obtidos sem tratamento, visto que, nestes últimos a introdução de um maior número de grupos ionizáveis, para aumentar a capacidade de troca, acarreta em uma destruição da matriz, formando polímeros solúveis em água.

Na Tabela 2.1 estão apresentadas as características de alguns trocadores iônicos baseados em celulose.

Trocadores iônicos baseados em dextrana são preparados a partir do entrecruzamento de cadeias de poliglicose linear com glicerina-éter, para resultar em um carboidrato hidrofílico insolúvel. Grupos iônicos, ácidos ou básicos, podem ser ligados aos grupos "OH" da unidade de glicose, que compõem a cadeia do polis-

Tabela 2.1 Características de alguns trocadores iônicos baseados em celulose (59).

trocadores aniônicos	grupo ionizável	capacidade (meq/g)	força básica
*DEAE-celulose	dietilaminoetil	0.1-1.1	moderada
TEAE-celulose	trietilaminoetil	0.5-1.0	forte
GE-celulose	guanidoetil	0.2-0.5	forte

trocadores catiônicos	grupo ionizável	capacidade (meq/g)	força ácida
*CM-celulose	carboximetil	0.5-1.0	fraca
P-celulose	fosfato	0.7-7.4	**

\* - forma microgranular

\*\* - grupos fracos ou fortes dependendo do pH.

sacarídeo.

Sephadex SPC-25, empregado por Stunzi (18) é um exemplo deste tipo de trocador, onde o grupo funcional é o sulfopropil (trocador fortemente ácido).

O gel de acrilamida é obtido através da polimerização de acrilamida ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH}_2$ ) em presença de metilenebisacrilamida ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ ).

Dextran e gel de acrilamida são insolúveis em água e em soluções aquosas. O primeiro não é afetado por soluções alcalinas, enquanto que, o segundo não pode ser usado em pH acima de 10. Ambos são estáveis em soluções ácidas (pH = 2); a exposição a agentes oxidantes fortes deve ser evitada em ambos os casos.

Trocadores inorgânicos como sais de ácidos (fosfatos, molibdatos, arsenatos, fosfomolibdatos), sulfetos metálicos (Ag(I), Fe(II), Zn(II), Cu(II), etc.) e gel de fosfatos inorgânicos (hidroxiapatita) possuem vantagens, sobre os materiais citados anteriormente, como maior estabilidade frente a altas doses de radiação e altas temperaturas, e maior seletividade a certos íons como rubídio e cézio (59). Por outro lado, este tipo de material pode sofrer solubilização ou peptização em certos valores de pH, onde as resinas são estáveis, ou podem ser solúveis em determinados solventes que não solubilizam as resinas.

### 2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária de troca iônica

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica cromatográfica que tem apresentado um grande desenvolvimento, nos últimos anos. A CLAE surgiu a partir da necessidade de

se diminuir o diâmetro das partículas da fase estacionária, para aumentar a eficiência das colunas. Essa redução no diâmetro das partículas acarreta em uma maior resistência à vazão da fase móvel, e então, há necessidade de um sistema para impulsionar a fase móvel através da coluna.

O equipamento utilizado em CLAE consiste de: reservatório para a fase móvel, bomba, injetor, coluna, detector e registrador.

O reservatório da fase móvel é um frasco que contém a fase móvel, que será levada para a coluna através da bomba. Em alguns equipamentos o reservatório é parte da própria bomba, e neste caso, quando a fase móvel termina dentro do reservatório, há necessidade de parar a operação de análise para reabastecê-lo. Alguns equipamentos possuem reservatórios munidos de sistemas para desgaseificação da fase móvel, como por exemplo, através da manutenção de um fluxo contínuo de um gás como hélio (preferencialmente) ou nitrogênio (57).

Além de ser isenta de gases, a fase móvel deve ser pura, livre de partículas, não deve interagir com a amostra e nem degradar a fase estacionária; deve ainda, ser compatível com o detector usado. A fase móvel é escolhida de acordo com o tipo de fase estacionária e tipo de amostra analisada.

A fase móvel pode ser mantida constante durante a análise, e neste caso, tem-se a eluição isocrática, ou pode ser mudada durante a análise, na chamada eluição com gradiente. A mudança da fase móvel durante a análise, quer seja na concentração dos componentes presentes, ou no pH tem como finalidade, melhorar a separação e diminuir o tempo de análise. No entanto, a eluição com gradiente apresenta algumas desvantagens como: necessidade de regenerar a coluna, isto é, voltar a estabilizar a coluna com a

fase móvel empregada no início da análise, e incompatibilidade com certos detectores. A pureza da fase móvel é um fator bastante crítico, no caso de eluição com gradiente, onde impurezas podem ficar retidas no topo da coluna no início da análise e quando começa-se a aumentar a força da fase móvel estas, impurezas começam a ser eluídas e aparecem como picos estranhos no cromatograma. Se a solução usada para tamponar a fase móvel for muito diluída, o pH pode mudar no começo da análise e causar instabilidade na linha de base, dependendo do detector usado (69).

A bomba é responsável pela manutenção da vazão da fase móvel através da coluna. A resistência a altas pressões ( $350 \text{ kg/cm}^2$ ) e produção de vazões constantes, livres de pulsações são características bastante importantes (70).

Dois diferentes tipos de bombas podem ser usados em CLAE:

- a- pressão constante
- b- vazão constante

As bombas de vazão constante possuem a vantagem de manter a vazão constante durante a análise, mesmo que haja uma mudança na resistência ao fluxo, por exemplo, em casos onde se realiza eluição com gradiente empregando solventes de viscosidade muito diferentes. Isto é muito importante porque tempos de retenção, resolução e características da linha de base dependem da vazão da fase móvel.

O injetor é o sistema por onde a amostra é introduzida no topo da coluna. Como a pressão neste ponto geralmente é alta, a injeção da amostra deve ser feita empregando-se válvulas resistentes a altas pressões ( $350 \text{ kg/cm}^2$ ). Estas válvulas possuem

amostradores intercambiáveis, de volume definido, através dos quais é possível introduzir volumes pequenos de amostra (5, 10, 20, 50 e 100  $\mu$ l) com grande reprodutibilidade (68). Atualmente, existem no mercado válvulas contendo amostradores internos de 0.2 a 1  $\mu$ l para aplicação em CLAE em colunas com microdiâmetro (Capítulo 3)

A coluna geralmente é constituída em aço inox por ser um material resistente a altas pressões e inerte à maioria dos solventes empregados em CLAE (71). A fase estacionária contida na coluna é constituída de partículas de pequeno diâmetro, sendo desejável que a faixa de diâmetro seja o menor possível. Estas partículas podem ter forma esférica ou irregular, serem totalmente porosas ou pelliculares. Detalhes sobre fases estacionária empregadas em cromatografia por troca iônica serão apresentados posteriormente.

Os detectores mais empregados em CLAE são os detectores por índice de refração, por absorção no ultravioleta ou visível e por condutividade. Outros detectores como o por fluorescência, polarográfico, coulométrico, etc. (72) também estão sendo utilizados em aplicações mais específicas.

Neste trabalho foi empregado um detector por absorção no ultravioleta e visível. Este tipo de detector pode operar em um único comprimento de onda (254 nm e em alguns casos em 280 nm) ou possuir um sistema que torna possível a mudança do comprimento de onda, tanto na faixa do ultravioleta como no visível (70). A seletividade pode ser controlada escolhendo-se um comprimento de onda onde ocorre absorção por parte dos compostos analisados. Estes detectores são pouco sensíveis à variações da vazão da fase móvel e temperatura; podem ser empregados em análises com gradiente, se a fase móvel não absorver no comprimento de onda em

que ele está operando.

Além desse equipamento básico, pode-se adicionar outros componentes ao sistema, quer seja para facilitar o trabalho, ou para melhorar as condições de separação, estabilidade ou sensibilidade: amortecedor de pulsos, controlador de temperatura para a coluna e detector, integradores eletrônicos, duas ou mais bombas e controladores da fase móvel para análises empregando eluição com gradiente, etc.

#### 2.2.2.1 Características da fase móvel e fase estacionária empregadas em cromatografia por troca iônica

Na cromatografia por troca iônica emprega-se soluções aquosas de sais, preferencialmente tamponadas, para manter o pH constante. Soluções tampão adequadas para uso em cromatografia por troca iônica são: fosfato, citrato, formato, acetato, borato, etc. (57).

Alguns diferentes tipos de fase estacionária para troca iônica tem sido usados em CLAE:

- a- partículas poliméricas porosas
- b- partículas peliculares
- c- partículas porosas com fase quimicamente ligada

#### a- Partículas poliméricas porosas

As mesmas resinas, baseadas em poliestireno-divinilbenzeno, utilizadas em cromatografia por troca iônica clássica podem ser usadas neste caso, se as partículas possuírem um menor diâme-

tro, tipicamente igual a 10  $\mu$ m.

As colunas resultantes apresentam menor eficiência que as colunas recheadas com outros materiais de troca iônica, devido à lenta difusão das moléculas da amostra na estrutura altamente porosa da resina. Outra desvantagem deste tipo de material é sua baixa rigidez mecânica, que faz com que haja quebra das partículas. As partículas finas resultantes provocam um perda na eficiência da coluna e também um aumento na pressão.

Em contraste com estas desvantagens, as resinas de troca iônica possuem alta capacidade de troca (3-5 meq/grama de resina seca), o que é uma fator muito importante quando se deseja injetar uma maior quantidade de amostra. Outra vantagem na utilização de resinas é a ampla faixa de pH em que elas podem ser usadas, como já foi indicado anteriormente.

#### b- Partículas peliculares

As partículas deste tipo de fase estacionária são de sílica ou esferas de vidro, recobertas ou ligadas apenas superficialmente com trocadores iônicos como poliestireno (73), silicone, fluorcarbono, etc. Estes materiais toleram altas pressões, no entanto, são disponíveis com tamanho de partículas relativamente alto (30-40  $\mu$ m). A obtenção de colunas com alta eficiência devido ao emprego destas partículas peliculares, onde o processo de difusão da amostra é mais rápido, fica limitada pelo diâmetro elevado das partículas (74). Outro fator limitante na utilização deste tipo de fase estacionária é a baixa capacidade de troca (10 a 100  $\mu$ eq/grama).

Devido a estes inconvenientes, e também, devido ao grande sucesso obtido com micropartículas de sílica com a fase

estacionária quimicamente ligada, o interesse por este tipo de material tem diminuído bastante (75,76).

#### c- Partículas porosas com fase quimicamente ligada

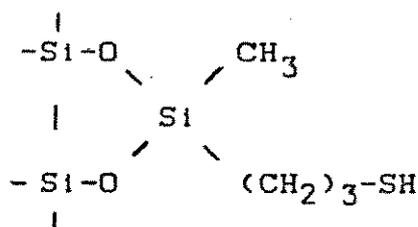
Partículas porosas de sílica de pequeno diâmetro (5-10  $\mu\text{m}$ ) podem ser ligadas quimicamente a trocadores iônicos, resultando em um material resistente a pressão e com capacidade de troca maior que a obtida com fase estacionária pelicular (0.5 a 2 meq/grama) (57).

As colunas obtidas apresentam eficiência elevada, em comparação com a obtida com outros trocadores iônicos, devido ao diâmetro reduzido das partículas, e também, devido à difusão do soluto na fase estacionária ser mais rápida que em resinas de troca iônica (57).

Várias reações têm sido utilizadas para introduzir grupos sulfônicos em partículas de sílica, para obtenção de trocadores catiônicos, através de cadeia carbônica alifática (77-81) ou aromática (82-85).

Roy e colaboradores (79) trataram partículas de sílica com glicidoxipropiltrimetoxissilano formando um epóxido, que depois de hidrolisado com ácido clorídrico resultou na glicerilpropilsililsílica, utilizada como matriz para introdução de diversos grupos, inclusive o sulfônico, neste caso, através da reação com sulfito de sódio.

Fazio e colaboradores (80) trataram partículas de sílica de 10  $\mu\text{m}$  com 3 mercaptopropilmetildimetoxissilano, obtendo a seguinte estrutura:



A função SH foi oxidada com ácido peroxioctanóico ou ácido peroxiacético, produzindo o grupo  $-\text{SO}_3\text{H}$ .

Wheals (81) também introduziu grupos R-SH ao esqueleto de sílica através da reação com 3 mercaptopropiltrimetoxissilano e depois efetuou a oxidação com permanganato de potássio em meio ácido.

Locke e colaboradores (82) empregaram reações de Grignard para introduzir grupos benzil ou naftil com posterior reação com ácido clorosulfônico para obtenção dos grupos  $-\text{SO}_3\text{H}$ .

Saunders (83) também empregaram o ácido clorosulfônico para sulfonar a benzil sílica obtida a partir do tratamento de partículas de sílica com cloreto de tionila e benzil lítio.

Asmus e colaboradores (84) empregaram clorodimetil(4 fenilbutil)silano e sulfonação com ácido sulfúrico em meio a ácido acético. O reagente 2-feniletiltriclorosilano foi empregado para introduzir o anel benzênico à partículas de sílica. Novamente, a sulfonação foi obtida com ácido clorosulfônico (85).

Foram apresentados apenas alguns métodos de preparação de trocadores iônicos baseados em sílica, particularmente os trocadores catiônicos. Maiores detalhes sobre os diferentes tipos de fases estacionárias disponíveis no comércio podem ser encontrados nas referências 75,76,86 e 87.

A Tabela 2.2 mostra uma comparação entre os três tipos de trocadores iônicos empregados em CLAE (57).

Além desses materiais pode-se citar ainda a utilização de polidextran (88), celulose (89) e polímeros de fluorcarbono

modificado (fenil Kel-F) (90), com aplicações principalmente na separação de produtos biológicos.

Tabela 2.2 Comparação entre os diferentes tipos de fase estacionária para cromatografia por troca iônica.

propriedade	pelicular	sílica porosa resina	
$d_p$ (um)	30-40	5-10	7-10
capacidade de troca (meq/g)	0.01-0.1	0.5-2	3-5
resistência mecânica	excelente	multo boa	baixa
forma	esférica	esférica ou irregular	esférica
queda de pressão	baixa	alta	alta
eficiência	moderada	alta	moderada
faixa de uso (pH)	2-9(recob) 2-7(11g)	2-7.5	0-12(an) 0-14(cat)

#### 2.2.2.2 Enchimento de colunas

A resolução entre dois compostos depende da eficiência da coluna usada, que por sua vez, depende de um bom enchimento. Existem vários métodos para o enchimento de colunas utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência. A seguir serão vistos alguns métodos disponíveis para o enchimento de colunas com os três tipos de fases estacionárias descritos para cromatografia

por troca iônica.

#### a- Enchimento com partículas poliméricas porosas

O enchimento de colunas com partículas poliméricas porosas, ou seja, resinas, normalmente é feito com solventes aquosos, a pressões na ordem de  $200 \text{ kg/cm}^2$ , para evitar a quebra das partículas. Prepara-se uma suspensão da resina na própria fase móvel que vai ser empregada nas análises, ou em um solvente, como por exemplo, uma solução aquosa de cloreto de cálcio (92), na técnica de densidade balanceada, para evitar a sedimentação das partículas. Esta suspensão é introduzida na coluna, sob pressão, utilizando o mesmo solvente empregado para preparar a suspensão, ou um outro de menor viscosidade.

É aconselhável deixar a fase estacionária em contato com o solvente utilizado no preparo da suspensão por algum tempo, porque, como já foi indicado, estas resinas entumescem ou se contraem, dependendo do pH, presença de eletrólitos, natureza destes eletrólitos, etc. Se a coluna é recheada antes de se atingir o equilíbrio, pode ocorrer vazios depois do enchimento ou após algum tempo de uso.

#### b- Enchimento com partículas peliculares

Para partículas com diâmetro maior que  $20 \mu\text{m}$  o enchimento pode ser efetuado a seco. A coluna é preparada através da adição de pequenas quantidades da fase estacionária, enquanto que, a coluna sofre um movimento de rotação e vibração vertical (93). Vibração lateral, como é feito em colunas para cromatografia gasosa, não deve ser usado, porque neste caso, as partículas

maiores ficam próximas as paredes, enquanto que, as menores ficam no centro. Isto faz com que haja um perda na eficiência pois a velocidade da fase móvel no centro da coluna será mais lenta que nas proximidades das paredes (57).

c- Enchimento com partículas porosas com fase quimicamente ligada

Existem inúmeros métodos na literatura para o enchimento de colunas com partículas de sílica, principalmente para cromatografia por adsorção (94-98) e cromatografia com fase quimicamente ligada, tanto para fase reversa (99-101) como para fase normal (101), visto que estas fases fornecem colunas de maior eficiência. No entanto, são poucos os métodos citados para fase quimicamente ligada para troca iônica (85,91). Nestes métodos, prepara-se uma suspensão da fase estacionária em um solvente adequado, e introduz-se esta suspensão na coluna, sob pressão, empregando o mesmo solvente, ou um outro mais indicado.

Quando se fala sobre o enchimento de colunas com partículas finas dois pontos são bastante importantes: a sedimentação e a aglomeração das partículas.

As partículas usadas na preparação de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência não são monodispersas. Isto significa que quando se diz que as partículas possuem um diâmetro de 10  $\mu\text{m}$ , quer dizer que o diâmetro médio das partículas é este, mas que existem partículas de maior e menor diâmetro. Sendo assim, estas partículas irão sedimentar com velocidades diferentes. Se a suspensão da fase estacionária é deixada em repouso no reservatório, as partículas maiores irão sedimentar primeiro. Quando for aplicada a pressão para efetuar o enchimento, este não se-

rá homogêneo.

Para evitar a sedimentação das partículas, foram desenvolvidos dois métodos denominados de densidade balanceada e viscosidade balanceada. No primeiro caso, utiliza-se solventes densos como diiodometano e misturas de tetrabromoetano e tetracloretileno, que possuem a desvantagem de serem tóxicos (57). No método da viscosidade balanceada utiliza-se solventes viscosos como ciclohexanol e etilenoglicol. Neste método, devido a alta viscosidade do solvente, a pressão de enchimento deve ser alta, caso contrário, o tempo gasto será muito longo. Normalmente, emprega-se um solvente de menor viscosidade para introduzir a suspensão na coluna.

Atualmente, as partículas de sílica são produzidas numa faixa de diâmetro mais reduzida, o que torna a sedimentação mais homogênea podendo-se utilizar solventes menos viscosos como, metanol, acetona, álcool isopropílico, etc.

A aglomeração das partículas está relacionada com atrações eletrostáticas nas superfícies das partículas. Estas forças eletrostáticas são maiores em partículas de menor diâmetro, devido a maior área superficial específica. A formação destes aglomerados reduz a eficiência das colunas.

A aglomeração das partículas pode ser reduzida usando estabilizadores químicos, como soluções diluídas de amônia (102). Este procedimento não encontra muita aplicação com fase quimicamente ligada, pois o pH da solução, aproximadamente igual a 10, acarreta em quebra das ligações entre a sílica e a fase estacionária.

Outro procedimento para minimizar forças eletrostáticas entre as partículas, é através da adição de ácidos orgânicos como, o ácido n-heptanóico e ácido dicloroacético (103), que promo-

vem a protonação dos sítios ativos da sílica.

A concentração da suspensão é um item que gera controvérsia. Alguns autores sugerem que suspensões concentradas até 25% (m/v) ainda produzem colunas eficientes (95), enquanto que outros, preferem utilizar suspensões mais diluídas, abaixo de 10% (104), o que torna a sedimentação mais lenta.

A pressão utilizada para efetuar o enchimento varia de acordo com o tamanho da coluna, diâmetro das partículas e solvente empregado no enchimento.

## CAPÍTULO 3

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EMPREGANDO COLUNAS  
COM MICRODIÂMETRO

## 3. 1 Introdução

Nos últimos anos, tem-se dado grande ênfase no desenvolvimento de cromatografia líquida de alta eficiência empregando colunas com microdiâmetro, ou seja, com um diâmetro interno menor que o de colunas analíticas convencionais (4-5 mm). As colunas com microdiâmetro são classificadas em 4 categorias.

## a- Colunas capilares

Neste tipo de colunas tem-se a fase estacionária líquida, como  $\beta$ ,  $\beta'$  oxidipropionitrila e 1,2,3-tris(2-cianoetoxi)propano (105), recobrando a superfície interna da coluna, ou fases estacionárias ligadas quimicamente à superfície de sílica fundida (material de construção do tubo), através de ligações siloxanos, como no caso de octadecilsilanos (106) ou fases estacionárias de troca iônica (107).

As primeiras colunas deste tipo foram desenvolvidas por Nota e colaboradores (108), para a separação de dimetilaminonafaleno-5-sulfonilaminoácidos. Devido ao elevado diâmetro interno das colunas (230, 260 e 300  $\mu$ m) não obtiveram bons resultados. Atualmente, tem-se conseguido colunas mais eficientes, com menor

diâmetro interno (105). Estas colunas possuem comprimentos de 0.5 a 35 m e são operadas com vazões de 0.01 a 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Devido a quantidade de fase estacionária disponível ser muito baixa, a capacidade da coluna também é muito reduzida.

#### b- Colunas capilares recheadas

Estas colunas são preparadas enchendo-se um tubo de vidro com partículas de 10 a 100  $\mu\text{m}$ , resistentes a altas temperaturas, como alumina ou sílica (105). Deste tubo recheado é feito um capilar com diâmetros típicos de 50 a 200  $\mu\text{m}$  e comprimentos de 10 a 60 m. Ao suporte contido no capilar é ligada a fase estacionária, que pode ser fase normal, fase reversa ou de troca iônica (109).

Aqui também, as vazões da fase móvel são reduzidas (0.01 a 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), bem como a capacidade da coluna obtida.

#### c- Colunas recheadas com microdiâmetro na faixa de 0.1 a 0.5 mm

Ishii e colaboradores (110) utilizaram tubos de teflon de 0.25 a 0.5 mm de diâmetro interno e 5 a 30 cm de comprimento, recheados com partículas de 5 a 30  $\mu\text{m}$ . Estas colunas foram recheadas através da sucção da suspensão da fase estacionária em um solvente adequado, empregando uma bomba.

Este tipo de coluna foi bastante estudado pelo grupo de Ishii (111-113), empregando também, outros materiais para a construção das colunas, como: aço inox, vidro pyrex e sílica fundida.

Atualmente, colunas preparadas com sílica fundida apresentam alta eficiência (92000 pratos teóricos para uma coluna de

0.32 mm x 1 m recheada com fase reversa, partículas de 3  $\mu\text{m}$  (105) e alto poder de resolução, além das vantagens de baixo consumo de fase móvel (0.1 a 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), alta resistência mecânica (800  $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), boa flexibilidade e transparência.

d- Colunas recheadas com microdiâmetro na faixa de 0.5 a 2 mm

Nesta categoria estão incluídas as colunas de aço inox ou teflon de 0.5 a 2 mm de diâmetro interno e comprimentos de 0.1 a 1 m. Estas colunas são recheadas com partículas de 3 a 20  $\mu\text{m}$ , a altas pressões, usando técnicas similares às empregadas no enchimento de colunas de maior diâmetro.

Os outros tipos de colunas com microdiâmetro possuem as desvantagens de capacidade muito reduzida, o que implica na utilização de sistemas especiais para a injeção da amostra e detectores com maior sensibilidade. Além disso, estas colunas requerem bombas capazes de produzir vazões baixas e reprodutíveis.

No momento, ainda não existe, comercialmente, grande disponibilidade de colunas e equipamentos destas três categorias. Isto não ocorre com colunas de diâmetro interno na faixa de 0.5 a 2mm; vários fabricantes dispõem de colunas, principalmente de 1 e 2 mm, e equipamentos adequados. Devido a este fato, nos próximos itens será dado ênfase às colunas de 0.5 a 2 mm de diâmetro interno.

Esta classificação visa apenas uma melhor organização nos dados sobre os vários tipos de colunas estudados. Os limites de dimensões das colunas e vazões da fase móvel são flexíveis. Outros sistemas de classificação podem ser encontrados na referência 114.

### 3.2 Vantagens na utilização de colunas com microdiâmetro

As colunas com microdiâmetro possuem uma série de vantagens sobre as colunas analíticas convencionais de 4 a 5 mm de diâmetro interno.

A principal vantagem na utilização de colunas com microdiâmetro é a grande economia de fase estacionária e principalmente, de fase móvel. Mudando-se o diâmetro interno de uma coluna de 4.6 para 1 mm, tem-se uma economia de solvente de aproximadamente vinte vezes, porque, vazões reduzidas, na faixa de 30 a 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ , são necessárias no emprego destas colunas. Esta economia de fase móvel torna possível a utilização de solventes caros ou não usuais, em casos de separações onde é exigida uma seletividade não conseguida com os solventes mais comuns.

Outra vantagem das colunas com microdiâmetro sobre as colunas convencionais é a maior sensibilidade à massa. Se a sensibilidade do detector é mantida a mesma quando usado em colunas com microdiâmetro ou em colunas convencionais, e se esta sensibilidade é de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e o volume do pico eluído é de 1 ml, para a coluna convencional, então, 0.5  $\mu\text{g}$  pode ser detectado, assumindo que a concentração no máximo do pico é duas vezes a concentração média do pico (115). Se for usada uma coluna de mesmo comprimento e eficiência, mas de diâmetro interno de 1 mm, então, o volume do pico será de apenas 50  $\mu\text{l}$  e a quantidade necessária para ser detectada é agora 25 ng, já que a sensibilidade é mantida a mesma (115).

Bowermaster e McNair (118) não concordam com esta vantagem, porque a quantidade de amostra que pode ser injetada nas

colunas com microdiâmetro é bem menor que nas colunas convencionais. Assim, se a massa da amostra é reduzida vinte vezes, a sensibilidade também será reduzida em vinte vezes, se o mesmo detector for usado. No entanto, como a vazão também é reduzida, a sensibilidade volta ao valor anterior, não sendo aumentada e nem diminuída.

Se a cela do detector for reduzida, para não haver perda na eficiência da coluna, o caminho óptico diminui, acarretando uma perda na sensibilidade.

É possível obter alta eficiência através do acoplamento de várias colunas, muito embora, o tempo de análise torne-se demasiado longo.

Colunas convencionais, se não são muito bem recheadas, quando acopladas não rendem a eficiência proporcional ao comprimento obtido, devido a dois fatores (119). O primeiro deles envolve o calor gerado pela alta pressão desenvolvida em colunas longas, quando a fase móvel é forçada através delas. Como estes líquidos possuem viscosidade significativa, uma considerável quantidade de trabalho é requerida para forçar o líquido através da coluna, que é convertido em calor, gerando um aumento na temperatura da fase móvel e da coluna. Este aumento na temperatura faz com que mude as propriedades de transferência de massa do soluto nas duas fases, causando uma dispersão do pico, além de uma assimetria devido a isothermas de adsorção não lineares.

O segundo fator envolve a não homogeneidade na permeabilidade da coluna em toda sua seção de choque. Essa permeabilidade não homogênea faz com que as moléculas da amostra movimentem-se, pela coluna, por caminhos muito diferentes, causando um aumento no termo  $A$  da equação de Van Deemter (Apêndice A). O aumento no comprimento da coluna, principalmente através do acopla-

mento, aumenta este efeito.

Estes dois efeitos são de menor importância quando emprega-se colunas com microdiâmetro. O efeito térmico é muito menor devido às vazões reduzidas empregadas, e como a secção de choque também é menor, a permeabilidade não homogênea também é reduzida, tornando possível o acoplamento de várias colunas, obtendo-se eficiências elevadas (119-122).

O acoplamento de colunas com microdiâmetro (120,121) é feito diretamente, com uniões adequadas, com apenas um filtro separando os dois recheios. Isto é feito para evitar perda na eficiência devido ao volume morto ou distúrbios no fluxo da fase móvel de uma coluna para outra.

Scott e Kucera (119) usaram partículas de 20  $\mu\text{m}$  em colunas de 1 mm de diâmetro interno. O acoplamento de várias colunas de 1 m de comprimento resultou em eficiências na ordem de 650000 pratos teóricos, no entanto, o tempo necessário para a análise foi de 9 horas. Kucera e Manius (121) conseguiram 250000 pratos teóricos no acoplamento de 9 colunas de 1 mm x 50 cm, recheadas com fase reversa, partículas de 8  $\mu\text{m}$ , em aproximadamente 20 horas de análise. Tsuda e Novotny (123) também estudaram o acoplamento de colunas conseguindo 85000 pratos teóricos em separações de 90 minutos.

O aumento no comprimento da coluna acarreta em um aumento na eficiência da coluna (124), no entanto, os tempos de análise requeridos, devido às baixas vazões, são muito longos. A utilização de colunas de menor comprimento, com partículas de diâmetro menor, resulta em alta eficiência com tempos de análise reduzido.

Vadukul e Loscombe (125) empregaram colunas de 1 x 150 mm recheadas com partículas de 3  $\mu\text{m}$ . Em comparação a uma coluna

de 1 x 500 mm, recheada com partículas de 10  $\mu$ m, o tempo de análise foi 2,5 vezes menor e o limite de detecção foi duas vezes melhor.

Quando a necessidade de uma separação não requer alta eficiência, mas sim, tempos de análise reduzidos, é possível utilizar colunas menores, ou empregar vazões acima do ideal (126-128). Estas análises rápidas são possíveis, sem um gasto excessivo de fase móvel, como ocorre com colunas de diâmetro convencional.

Kucera (127) relata a separação de diazepam e 4 metabólitos em 30 segundos, empregando uma coluna de 1 x 150 mm recheada com partículas de 10  $\mu$ m.

Scott e colaboradores (128) separaram 7 compostos em 30 segundos usando uma coluna de 1 x 250 mm recheada com partículas de 20  $\mu$ m.

Para análises rápidas é necessário que o tempo de resposta do detector e registrador também sejam reduzidos (129), devido à eluição muito rápida do pico.

Outra vantagem na utilização de colunas com microdiâmetro é a possibilidade de um melhor controle de temperatura da coluna, em análises onde se eleva a temperatura para obtenção de maior eficiência. O aumento na temperatura faz com que haja uma redução na viscosidade da fase móvel e aumento na velocidade de transferência de massa do soluto entre as duas fases, causando um aumento na eficiência (130). Bowermaster e McNair (118) sugerem o emprego de gradiente de temperatura durante a análise. Observaram que aumentando-se a temperatura de 25 a 100  $^{\circ}$ C, obtinha-se uma redução de 75% nos tempos de retenção de picos mais retidos, um aumento na sensibilidade devido ao menor volume de retenção, uma maior eficiência da coluna a maiores temperaturas, e também, uma

queda em 50% na pressão. A temperatura máxima usada é limitada pela estabilidade da fase estacionária usada.

### 3.3. Necessidades instrumentais na utilização de colunas com microdiâmetro

Os cromatógrafos utilizados com colunas convencionais, quando empregados com colunas de microdiâmetro, não fornecem os resultados desejáveis, devido ao grande volume morto relativo no sistema, que neste caso, é muito crítico. Portanto, é necessário que o equipamento seja adaptado para o emprego de colunas com microdiâmetro (131).

A injeção da amostra deve ser feita através de um sistema reprodutível, que resista a altas pressões, capaz de introduzir pequenas quantidades de amostra na coluna, devido a baixa capacidade, e onde o volume morto seja reduzido. Estes problemas relacionados com a injeção são muito mais críticos em colunas capilares e capilares recheadas. Atualmente, existem no mercado válvulas com amostradores internos de volumes reduzidos, entre 0.2 e 1  $\mu$ l, da Rheodyne Scientific Systems, e Valco. A conexão entre coluna e injetor também deve ser feita com um mínimo de volume morto, bem como, a ligação da coluna com o detector.

Os detectores por absorção no ultravioleta convencionais, que são os mais utilizados, possuem celas com volumes tipicamente de 5 a 10  $\mu$ l. Este volume é grande em relação ao volume de um pico eluído em colunas com microdiâmetro que é na ordem de poucos microlitros. A eficiência obtida na coluna pode ser perdida devido ao grande volume da cela do detector.

A figura 3.1 mostra como o volume da cela do detector é muito mais importante no aumento da largura do pico em colunas

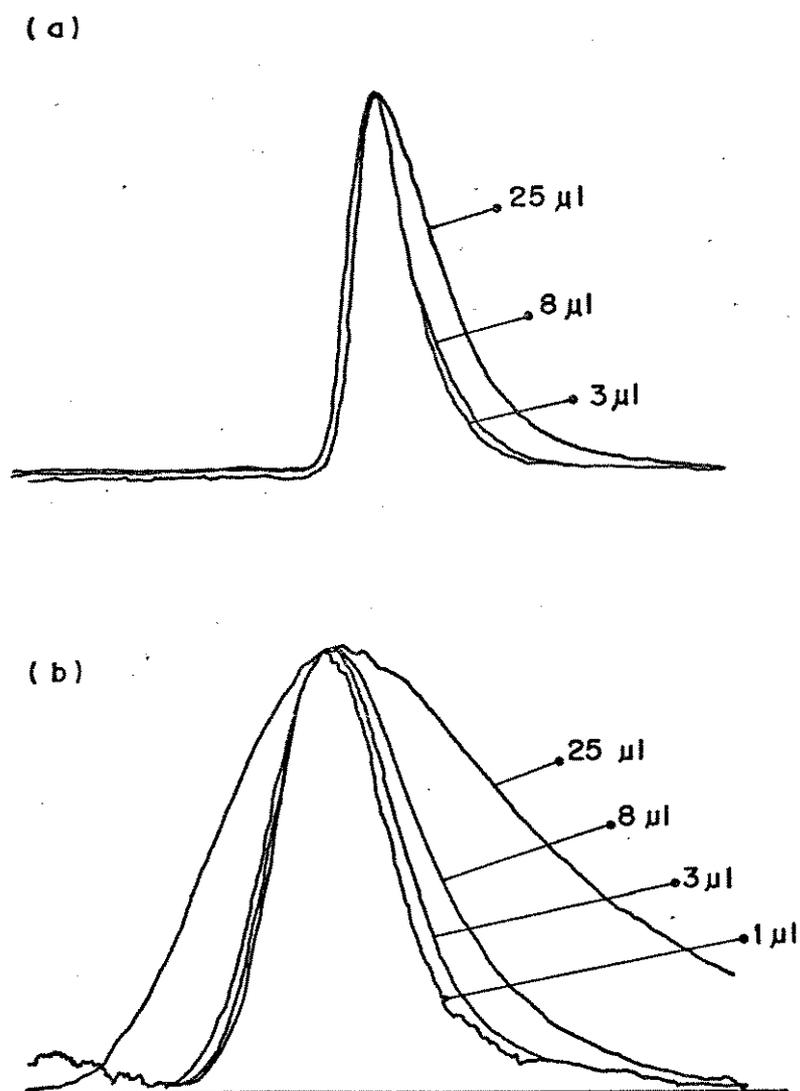


Figura 3.1 Influência do volume da cela do detector na largura dos picos obtidos com colunas de 4.6 (a) e 1 mm (b) de diâmetro interno (119).

com microdiâmetro que em colunas convencionais (119). Além de afetar a largura do pico, o volume exagerado da cela do detector, afeta também a simetria, como é visto para a cela de volume igual a 25  $\mu$ l, devido ao efeito da diluição logarítmica.

Alguns autores (119,132) propõem modificações em detectores por absorção no ultravioleta visando uma diminuição no volume da cela do detector, que idealmente deve ser de 0.5 a 1  $\mu$ l, para colunas de 1 mm, e nas conexões entre a coluna e detector.

Além dos detectores por absorção no ultravioleta, estão sendo desenvolvidos detectores que empregam LASER como fonte para absorção ou fluorescência, detectores eletroquímicos, detectores por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectrômetros de massa, etc. Devido ao volume reduzido do efluente da coluna, é possível utilizar espectrômetros de massa acoplados à saída da coluna da mesma maneira que é feito em cromatografia gasosa (133).

Outro fator importante na utilização de colunas com microdiâmetro é a necessidade de bombas capazes de gerar vazões baixas (5 a 100  $\mu$ l/min para colunas de 1 mm de diâmetro interno), com alta reprodutibilidade e livre de pulsações. Atualmente, são disponíveis bombas recíprocas adaptadas para gerar vazões reduzidas e bombas de deslocamento contínuo (tipo seringa), que permitem vazões de 0.02  $\mu$ l/min.

### 3.4. Eluição com gradiente

A eluição com gradiente em colunas com microdiâmetro pode ser em etapas (134), ou contínuo (127,135). No gradiente em etapas, o solvente forte é estocado em um amostrador de uma válvula, acoplada ao sistema, e é introduzido na coluna quando ne-

cessário. Válvulas com várias entradas podem ser usadas, para obtenção de gradientes múltiplos, apenas mudando-se o seletor da válvula para posições, onde solventes cada vez mais fortes possam ser introduzidos na coluna. A vantagem desta técnica é a possibilidade de utilização de apenas uma bomba.

Schwartz e colaboradores (135) descreveram um sistema de gradiente contínuo empregando duas bombas e sistemas de mistura estáticos e dinâmicos, com volumes de 20 a 172  $\mu$ l. Com o sistema de mistura dinâmica obtiveram precisão e reprodutibilidade na eluição, devido a mistura eficiente dos dois solventes empregados. Também obtiveram menores limites de detecção e menor ruído da linha de base.

### 3.5 Enchimento de colunas com microdiâmetro

O enchimento de colunas com microdiâmetro, sendo considerado aqui somente as colunas de 0.5 a 2 mm de diâmetro interno, requer maiores cuidados que para colunas convencionais, embora os métodos usados sejam similares, ou seja, introdução de uma suspensão da fase estacionária em um solvente adequado, sob alta pressão.

Scott e Kucera (119) sugerem que o método da densidade balanceada é o mais indicado para sílica. Em geral, quanto mais rápido for efetuado o enchimento, mais eficiente será a coluna; então o solvente ideal para preparar a suspensão deve ter baixa viscosidade e alta densidade. Por esta razão, misturas de iodeto de metila e pentano são indicados para enchimentos a base de sílica. No caso de fase reversa, os autores sugerem a utilização de métodos de viscosidade balanceada, usando glicerol 25% em metanol para a preparação da suspensão.

Outros sistemas de solventes são o metanol e 2 propanol (1:1) (125) para o enchimento com sílica, e iodeto de metila para preparar a suspensão de fase normal, deslocada com etanol:água (95:5) (136).

A pressão empregada no enchimento gira em torno de 1000 a 1700 kg/cm<sup>2</sup>, dependendo do comprimento da coluna, diâmetro das partículas e solvente utilizado no enchimento.

Outro fator que parece ter grande efeito na obtenção de colunas eficientes é a configuração do reservatório que contém a suspensão a ser introduzida na coluna. Menet (136) sugere o emprego de reservatórios cônicos na parte ligada à coluna e o emprego de uma pré-coluna com o mesmo diâmetro interno, colocada entre o reservatório e a coluna. Utilizou suspensões diluídas (1,5%) para evitar a sedimentação das partículas.

A tradução dos termos empregados em cromatografia foi feita utilizando a referência 137.

## CAPÍTULO 4

## OBJETIVOS

Este trabalho teve como primeiro objetivo o desenvolvimento de métodos cromatográficos para a separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), com diferentes graus de complexidade, que pudessem atender necessidades diversas.

- a- Um método empregando resina de troca catiônica, simples, de baixo custo, para ser utilizado neste laboratório na separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ .
- b- Um método empregando cromatografia líquida de alta eficiência, com fase estacionária de troca catiônica, visando a separação de um maior número de espécies, em curtos tempos de análise e empregando solventes de baixo custo.
- c- Dar início na utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência empregando colunas com microdiâmetro, tornando possível a separação das espécies de interesse, em análises rápidas e empregando solventes mais caros, que neste caso não encarecem a análise, devido as baixas vazões necessárias.

O segundo objetivo deste trabalho foi a utilização dos

métodos desenvolvidos no estudo do comportamento das espécies hidrolíticas, já que este estudo era dificultado pela não disponibilidade de métodos de separação adequados.

## CAPÍTULO 5

## PARTE EXPERIMENTAL

## 5.1 Reagentes

Reagente	Fabricante	Código	Lote
ácido clorídrico	Merck	317	30529
ácido fosfórico	Merck	573	4292
ácido nítrico	Ecibra Reagentes	126	5055
	Analíticos		
ácido perclórico	Reagen		830111
carbonato de cálcio	Carlo Erba	43318	60376
cloreto de bário	Carlo Erba	42502	182685
cloreto de mercurio	carlo Erba	46100	03176
dicromato de potássio	Riedel-De Haenag	31255	02623
dicromato de sódio	Baker Analyzed Reagen	3672	38764
hidróxido de potássio	Merck	5033	31211
hidróxido de sódio	Ecibra Reagentes Analíticos	1746	4232
metanol	Merck	6009	20411

nitrato de cálcio	Ecibra Reagentes	513	4526
	Analíticos		
óxido de cálcio	Carlo Erba	43405	20176
óxido de lantânio	Carlo Erba	457511	476106 DO 747
peróxido de hidro- gênio	Merck	7210	254424
sulfato de potás- sio	Riedel-De Haenag	31270	00157
zinco em pó	Grupo Química		
zinco 840 $\mu\text{m}$	Mallenckrodt	8701	3201

Cloreto de cálcio foi obtido a partir de ácido clorídrico e carbonato de cálcio. Acido perclórico foi utilizado na preparação de perclorato de cálcio e perclorato de lantânio, usando os respectivos óxidos. Depois de preparadas, as soluções foram submetidas ao ultra-som, para eliminação de gases (15 min).

## 5.2 Fases estacionárias e colunas

Resinas - Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA., USA.

AG 50W - X8	partículas de 106-250 $\mu\text{m}$ , recuperada
AG 50W - X8	partículas de 38-63 $\mu\text{m}$ , cód.1421461, lote 17510.
AG 50W - X4	partículas de 38 - 75 $\mu\text{m}$ , código 1421361, lote 18338.
AG 50W - X12	partículas de 38 - 63 $\mu\text{m}$ , código 1421661, lote 22675.

Partisil 10SCX      Partículas de 10  $\mu$ m, Whatman Chemical Separation Inc., cód. 4127-010, lote 100319, Clifton, NJ., USA.

Coluna (10x250 mm) Partículas peliculares de 30 a 44  $\mu$ m, Vydac SC cation, Altex Scientific, Inc., Berkeley, CA., USA.

coluna(3.2x500 mm) Partículas peliculares de 30 a 44  $\mu$ m, Vydac SC cation, Altex Scientific, Inc., Berkeley, CA., USA.

### 5.3 Instrumental

#### a- Sistema para cromatografia líquida clássica.

Bomba peristáltica      Milan Equipamentos Científicos Ltda., série p-200, Colombo, Pa., Brasil.

Coletor de frações      Instrumentation Specialties Company, modelo 328, Lincoln, NE., USA.

#### b- Sistema para cromatografia líquida de alta eficiência.

b.1- Bomba recíproca      Altex Scientific, Inc., modelo 110, Berkeley, CA., USA.

Programador de solvente	Master - Laboratory Data Control, modelo 1601, Riviera Beach, Fl., USA.
Misturador de solventes	Master - Laboratory Data Control, modelo 1000, Riviera Beach, Fl., USA.
Injetor com amostrador de 10 e 20 $\mu$ l	Rheodyne Inc., modelo 7010, Cotati, CA., USA.
Detector por absorção no ultravioleta e visível, com comprimento de onda variável, cela de 8 $\mu$ l registrador potenciométrico	Schoeffel Instruments, Div. of Kratos, Inc., modelo 770 Westwood, NJ., USA.  Equipamentos Científicos do Brasil Ltda., modelo RB-1001, São Paulo, SP, Brasil.
b.2- Bomba recíproca	Altex Scientific, Inc., modelo 110, Berkeley, CA. USA.
Amortecedor de pulsos entre a bomba e injetor	tubo de aço inox de 0.2 mm de diâmetro interno e 2 m de comprimento.
Injetor com amostrador interno de 1 $\mu$ l	Rheodyne Inc., modelo 7013, Cotati, CA., USA.
Detector por absorção no ultravioleta e visível e cela de 1 $\mu$ l.	Laboratory Data Control / Milton Roy, Riviera Beach, FL., USA.

Registrador potên  
ciométrico Equipamentos Científicos do  
Brasil Ltda., modelo RB-1001  
São Paulo, SP., Brasil.

c - Sistema para o enchimento de colunas usadas em CLAE.

Bomba de alta pressão Shandon Packing System, mo-  
delo RR/025, HPLC Technology  
Ltd., Macclesfield, Cheshi-  
re, UK.

d - Sistema para contagem dos fótons gama emitidos  
pelo  $^{51}\text{Cr}$ .

Detector com cristal Bicon Corporation, modelo  
de NaI, tipo poço MW2/2, Newbury, Ohio, USA.  
Pré-amplificador Hewlett Packard Company, mo-  
delo 5554A, Palo Alto, CA.,  
USA.

Amplificador linear Hewlett Packard Company, mo-  
delo 5582A, Palo Alto, CA.,  
USA.

Analizador monocanal Hewlett Packard Company, mo-  
delo 5983A, Palo Alto, CA.,  
USA.

Timer EG & G-Ortec, Inc., modelo  
719, Oak Ridge, TN, USA.

Scaler Timer Braselle Eletrônica S.A.,  
modelo SE-1272, São Paulo,  
SP., Brasil.

Fonte de alta voltagem	Eg & G-Ortec, Inc., modelo 456, Oak Ridge, TN., USA.
Analizador multi- canal	Northern Scientific Inc., modelo Econ III, Middleton, WI., USA.
e- pHmetro	Orion Research Inc., modelo 301, Cambridge, MA., USA.
f- Espectrofotômetro de absorção óptica DMR-21	Carl Zeiss, Oberkochen, Wuertt, West Germany.
g- Ultra-som	Branson Sonic Power Company, Sonifier B-12, Danbury, CO., USA.

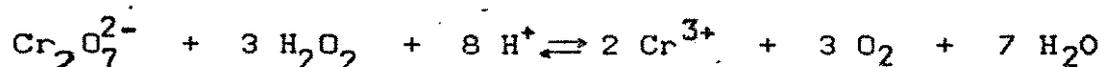
#### 5.4 Preparação de amostras

Amostras contendo uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III) foram preparadas a partir de uma solução de perclorato de cromo 0.1 mol/l, pH = 1. Esta solução foi obtida reduzindo-se uma solução de dicromato de potássio com peróxido de hidrogênio, em presença de ácido perclórico (31).

A adição de ácido perclórico a uma solução de dicromato de potássio leva à formação de um precipitado branco de perclorato de potássio, que foi eliminado por filtração, em papel de filtro. A adição de peróxido de hidrogênio foi feita lentamente, com resfriamento da solução (- 4°C), para minimizar a polimerização,

como observado experimentalmente.

A solução obtida após a redução apresentou pH aproximadamente igual a 1 e coloração violeta, correspondente à espécie 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 abaixo (138):



Este oxigênio, bem como o excesso de peróxido de hidrogênio, foram eliminados borbulhando-se nitrogênio por 12 horas, sob agitação constante. A seguir, esta solução foi deixada em contato com 100 µg de negro de platina (oxidação de peróxido de hidrogênio) por 4 horas, sob agitação, e posteriormente, filtrada em membranas de teflon com poros de 5 µm, para eliminar as partículas de platina.

Para preparação de amostras contendo espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}(\text{III})$  empregou-se cloreto de  $^{51}\text{Cr}$  obtido no CNEN, São Paulo, SP., Brasil. Este material, além de possuir a espécie monomérica hexaaquo, possui também, porcentagens variadas de espécies com 1, 2 e 3 cloretos substituindo moléculas de água na esfera de coordenação do cromo, e pequenas quantidades de polímeros, na ordem de 2%. O tratamento desse cloreto de cromo com ácido perclórico concentrado, através da evaporação do ácido (3 vezes), seguido de redissolução em ácido perclórico 0.05 mol/l, levou a uma drástica redução na porcentagem de espécies contendo cloreto na esfera de coordenação do cromo (aproximadamente 0.5%). A desvantagem desse método é que devido ao aquecimento houve um aumento na quantidade de polímeros para aproximadamente 6%.

Para obtenção de amostras contendo uma mistura de espé-

cies hidrolíticas de Cr(III) foram empregados dois métodos:

a- Método da adição de hidróxido

A uma alíquota da solução de perclorato de cromo 0.1 mol/l adicionou-se hidróxido de sódio 3 mol/l até pH = 3 a 4, sob agitação. Para a preparação de amostras contendo espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , adicionou-se perclorato de  $^{51}\text{Cr}$  à solução original, e a seguir, adicionou-se o hidróxido de sódio, ou em alguns casos, primeiro adicionou-se o hidróxido de sódio até pH = 3-4, e depois o  $^{51}\text{Cr}$ .

Através deste procedimento obteve-se uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III) e a solução passou a apresentar uma coloração verde, devido a presença de polímeros.

b- Método do redutor de Jones

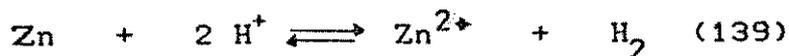
Este processo consta na redução de Cr(III) a Cr(II) empregando-se o redutor de Jones (zinco amalgamado com mercúrio, em meio ácido), e posterior oxidação deste Cr(II) a Cr(III) com oxigênio.

- Preparação do redutor de Jones (33).

Uma quantidade suficiente de Zn foi lavada com ácido perclórico 1 mol/l e resfriado em banho de gelo. A seguir adicionou-se uma solução de cloreto de mercúrio, em ácido perclórico 3 mol/l, em quantidade suficiente para obtenção de zinco com uma porcentagem de 1 ou 10% de mercúrio, dependendo do experimento. A adição de cloreto de mercúrio foi feita lentamente, com agitação e resfriamento da solução. Após cerca de

cinco minutos, o zinco amalgamado foi lavado com água desionizada e estocado na geladeira.

O zinco amalgamado, em meio ácido, é um redutor de menor potência que o zinco puro, evitando assim, a evolução excessiva de hidrogênio.



#### - Utilização do redutor de Jones

Com este zinco amalgamado recheou-se uma coluna de vidro (0.5 x 1.5 cm) e após sua ativação com 10 ml de ácido perclórico 0.05 mol/l, efetuou-se a eluição de uma alíquota da solução de perclorato de cromo. Dados a respeito das dimensões da coluna, porcentagem de mercúrio na amálgama, fluxo da solução através da coluna, etc. serão discutidos no capítulo 6.

À solução efluente da coluna, borbulhou-se oxigênio por 15 minutos, para oxidar todo Cr(II) formado no processo de redução. Este método leva a formação de uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III), com predominância da espécie dimérica. Para a preparação de espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  adicionou-se perclorato de  $^{51}\text{Cr}$  cromo à solução que iria ser eluída através da coluna de zinco amalgamado.

### 5.5 Tratamento de resinas de troca catiônica

As resinas empregadas nos experimentos de cromatografia em coluna clássica foram tratadas de duas maneiras. A resina AG 50W X-8 com partículas de 106-250  $\mu\text{m}$  foi tratada através de aque-

cimento em presença de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, por várias horas, sob agitação. Eliminou-se o peróxido de hidrogênio com lavagens sucessivas com hidróxido de sódio 1 mol/l e água. A seguir a resina foi convertida para a forma ácida com ácido perclórico 4 mol/l, lavada e estocada em água (44). Esta resina foi recuperada de análises anteriores.

As demais resinas sofreram um tratamento menos drástico:

- Adição de 20 ml de hidróxido de sódio 0.1 mol/l a 10 g de resina.
- Decantação e nova adição de 20 ml de peróxido de hidrogênio 1% em hidróxido de sódio 0.1 mol/l.
- Lavagem repetida com água desionizada, para eliminação do peróxido de hidrogênio e da base, até pH neutro.
- Adição de 1 ml de dicromato de sódio 0.2 mol/l e lavagem com ácido perclórico 0.1 mol/l, repetidas vezes, até eliminação de toda coloração amarela causada pela solução do dicromato de sódio.
- lavagem com água desionizada, até pH neutro.

Estas resinas foram empregadas em experimentos utilizando colunas de vidro. Efetuou-se um novo tratamento da resina, na própria coluna, antes da análise; este tratamento foi feito eluindo-se 0.5 ml da solução de dicromato de sódio 0.2 mol/l e 5 ml de ácido perclórico 0,01 mol/l. Todos estes tratamentos foram efetuados para evitar reações de oxidação de Cr(III) ou redução de Cr(VI), dentro da coluna.

#### 5.6 Enchimento das colunas empregadas em CLAE

Para o enchimento das colunas utilizadas em CLAE empregou-se uma bomba de alta pressão, como indicado na Figura 5.1.

A suspensão da fase estacionária em um solvente adequado é colocada no reservatório, que por sua vez, é ligado à coluna a ser recheada. A pressão de um gás (nitrogênio) faz movimentar um pistão que envia um solvente para empurrar a suspensão para dentro da coluna, a pressões que podem ser variadas dependendo do diâmetro das partículas e dimensões da coluna.

Para o enchimento de colunas de 4,6 mm de diâmetro interno empregou-se um reservatório com volume de 27 ml. A união entre reservatório e coluna foi feita empregando-se um restritor cônico para reduzir o diâmetro interno de 10 mm (reservatório) para 4,6 mm (coluna), e uma pré-coluna de 4.6 x 50 mm. Este procedimento tem como finalidade fazer com que a suspensão entre de maneira mais homogênea para dentro da coluna, para resultar em maior eficiência.

Empregou-se perclorato de cálcio 0.1 mol/l, pH = 2 para preparar a suspensão da fase estacionária (10% m/v). Após agitação da suspensão no ultra-som por 5 minutos, esta foi introduzida rapidamente no reservatório e efetuou-se o enchimento com o mesmo solvente, a uma pressão de  $350 \text{ kg/cm}^2$ .

Para o enchimento de colunas de 1 e 2 mm de diâmetro interno utilizou-se as mesmas condições, variando-se somente a configuração dos reservatórios e a pressão de enchimento: para colunas de 1 mm empregou-se um reservatório com volume de 3 ml e um restritor cônico de 4.6 para 1 mm, e não se utilizou pré-coluna entre o reservatório e a coluna; para as colunas de 2 mm de diâmetro interno empregou-se um reservatório de 6 ml, um restritor cônico de 6 para 2 mm e uma pré-coluna de 2 x 50 mm; a pres-

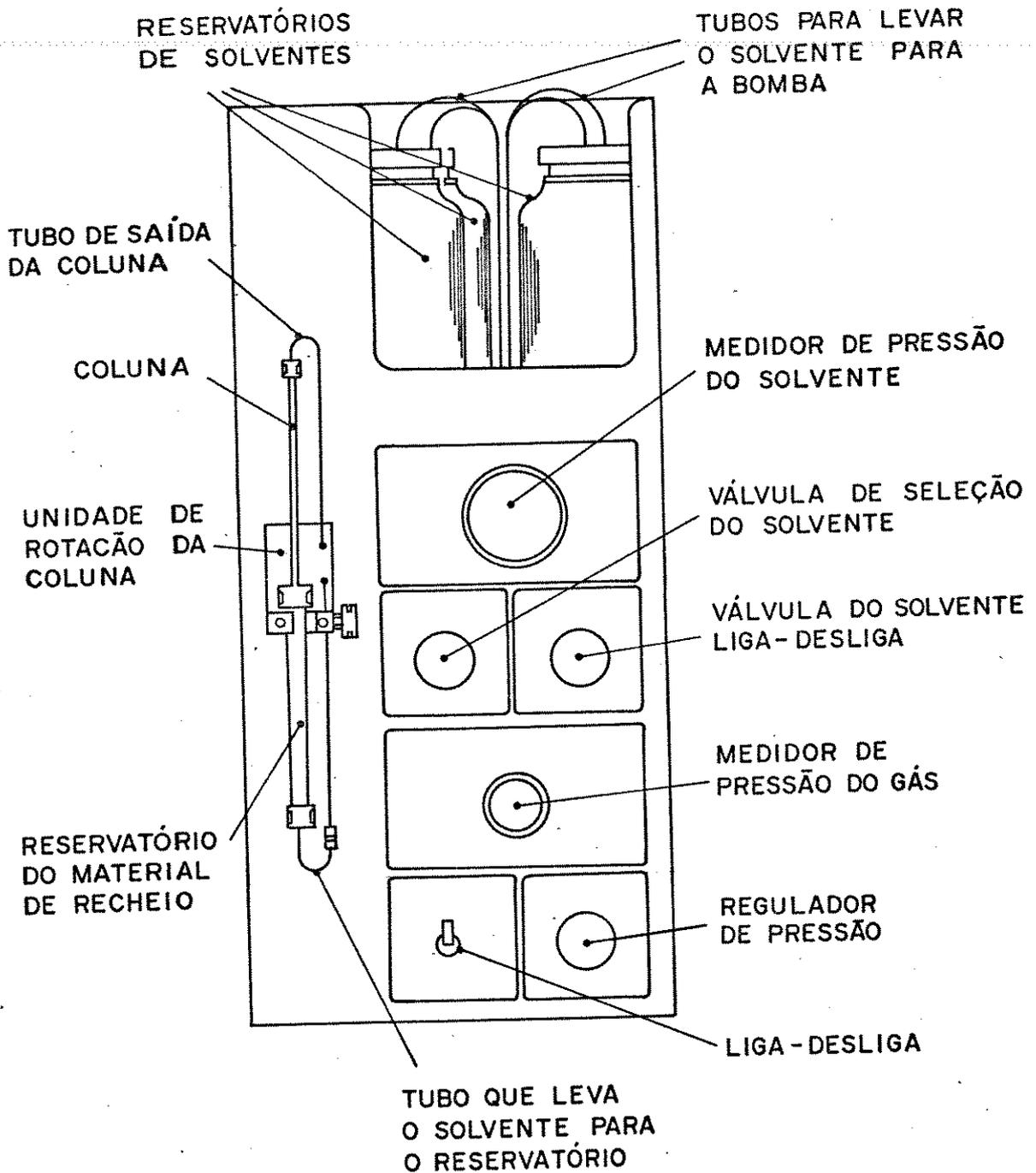


Figura 5.1 Esquema da bomba empregada no enchimento das colunas utilizadas em CLAE.

são empregada para efetuar o enchimento foi de 500 e 350 kg/cm<sup>2</sup> para as colunas de 1 e 2 mm de diâmetro interno, respectivamente.

### 5.7 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando resinas de troca catiônica

Resinas de troca catiônica foram empregadas em 3 categorias de experimentos.

#### a- Método convencional

Neste caso, empregou-se colunas de vidro (0.5 x 6 cm) recheadas com resinas AG 50W X-8, partículas de 106-250  $\mu$ m. A eluição das espécies foi feita com soluções de ácido perclórico e ácido clorídrico (37,38). A detecção foi feita verificando-se a atividade presente em frações coletadas, visto que, nestes experimentos, empregou-se amostras contendo espécies marcadas com <sup>51</sup>Cr, (Apêndice C).

#### b- Método do nitrato de cálcio

Para estes experimentos empregou-se resina AG 50W X-4, partículas de 38-75  $\mu$ m, em uma coluna de vidro de 0.6 x 2 cm. Os solventes empregados na eluição, nitrato de cálcio em várias concentrações e nitrato de lantânio 0.5 mol/l, foram preparados com água desionizada; a eluição foi feita empregando-se uma bomba peristáltica. Novamente, verificou-se a atividade presente em cada fração, bem como a atividade presente na resina, após o término da análise. Optou-se pela utilização de nitrato de cálcio por ser

um eluente de fácil preparação, de baixo custo, e devido à utilização de cálcio, na forma de perclorato, em trabalhos anteriores.

#### c- Método das colunas de politetrafluoretileno

Para estes experimentos empregou-se colunas de politetrafluoretileno (teflon) com 1,5 mm de diâmetro interno, recheadas com resinas AG 50W X-4, AG 50W X-8 e AG 50W X-12, partículas de 38-75  $\mu\text{m}$  e 38-63  $\mu\text{m}$ . Para o enchimento destas colunas empregou-se a bomba descrita no item 5.6. Utilizou-se solução de fosfato de sódio 0.1 mol/l, pH = 3 para suspender a resina e para efetuar o enchimento a uma pressão de 30 kg/cm<sup>2</sup>; o reservatório utilizado foi o de 27 ml, sem restritor cônico e pré-coluna.

Estas colunas foram empregadas com o sistema b1 descrito no item 5.3. Nestes experimentos, empregou-se soluções de fosfato de sódio e nitrato de cálcio, preparadas com água desionizada e filtradas em membranas de teflon com poros de 0.5  $\mu\text{m}$ . Utilizou-se agitação no ultra-som, por 15 minutos, para eliminação de gases. As amostras utilizadas nestes experimentos, na maioria das vezes, não possuíam espécies marcadas com <sup>51</sup>Cr; neste caso, a detecção foi feita utilizando o detector por absorção no visível, em 415 nm.

#### 5.8 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando CLAE

Neste item, foram incluídas as colunas recheadas com Vydac SC Cation, partículas de 30 a 44  $\mu\text{m}$  (10 x 250 mm e 3.2 x 500 mm) e Partisil 10SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$  (4.6 x 200 mm). Os

eluentes empregados foram soluções de fosfato de sódio ou potássio, nitrato de cálcio e perclorato de cálcio, preparadas com água desionizada e filtradas em membranas de teflon com poros de 0.5  $\mu\text{m}$ , antes de serem utilizadas. Gases dissolvidos foram eliminados agitando-se a solução no ultra-som, por 15 minutos.

Efetou-se a detecção empregando o detector por absorção no visível em 415 nm, e em alguns casos, através da detecção da radioatividade presente nas frações coletadas, quando as amostras injetadas possuíam espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ .

#### 6.9 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando colunas com microdiâmetro

Colunas de 1 e 2 mm de diâmetro interno recheadas com Partisil 10SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$  foram utilizadas no sistema b2, descrito no item 5.3. Os eluentes, perclorato de cálcio e perclorato de lantânio, foram preparados com água desionizada e filtrados em membranas de teflon, com poros de 0.5  $\mu\text{m}$ . Eliminou-se os gases dissolvidos submetendo-se as soluções ao ultra-som por 15 minutos. A detecção foi feita utilizando-se o detector por absorção no visível, em 415 nm, e em alguns casos, através da atividade presente nas frações coletadas na saída do detector.

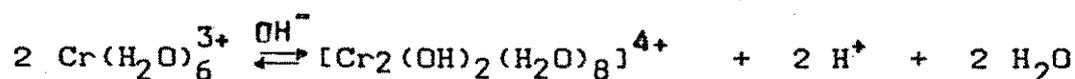
## CAPÍTULO 6

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 6.1 Preparação de amostras

## 6.1.1 Método da adição de hidróxido

Este método de preparação de misturas de espécies hidrolíticas de Cr(III) foi empregado por Stunzi (18). 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 (19). Em um experimento típico, a 1 ml de uma solução de perclorato de cromo, contendo monômero marcado com  $^{51}\text{Cr}$ , adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/l, lentamente e com agitação. Foram obtidos os seguintes resultados, utilizando o método do nitrato de cálcio:

monômero	- 76.2 %
dímero	- 7.7 %
trímero	- 3.6 %
polímeros	- 12.5 %

A análise foi efetuada após 24 horas de estocagem a temperatura ambiente, empregando o método do nitrato de cálcio.

Em outro experimento adicionou-se hidróxido de sódio 3 mol/l a uma solução de perclorato de cromo até pH = 3 e a seguir, adicionou-se o monômero marcado com  $^{51}\text{Cr}$ . Utilizando o mesmo método de análise, para a amostra estocada a temperatura ambiente por 24 horas, obteve-se o seguinte resultado:

monômero	- 25.5 %
dímero	- 11.5 %
trímero	- 11.4 %
polímeros	- 51.6 %

A quantidade de base adicionada e a forma de adição desta base fez com que houvesse uma mudança nas porcentagens das espécies formadas. Não foi feito um estudo cuidadoso a respeito da influência dos diversos fatores nas porcentagens dos produtos formados. Optou-se pela segunda versão do método, que produzia uma mistura mais homogênea das espécies de interesse.

#### 6.1.2 Método do redutor de Jones

Nos primeiros experimentos empregou-se zinco com partículas de 840  $\mu\text{m}$ , amalgamado com 1% de mercúrio, em colunas de vidro de 0.5 x 2 cm. As porcentagens de dímero e polímeros obtidos não foram satisfatórias e neste caso, optou-se pela utilização de zinco em pó (diâmetro de partículas não especificado). Devido a maior área superficial, houve necessidade de aumentar a porcentagem de mercúrio na amálgama, para reduzir a sua capacidade redutora, e assim, evitar a evolução excessiva de hidrogênio, dentro

da coluna.

Nas preparações posteriores empregou-se uma coluna de vidro de 0.5 x 1.5 cm recheada com zinco em pó, amalgamado com 10% de mercúrio, através da qual eluiu-se alíquotas de 5 ml da solução de perclorato de cromo, com ou sem o monômero marcado com  $^{51}\text{Cr}$ . Após eluição da amostra, borbulhou-se oxigênio na solução por 15 minutos, para oxidação de todo Cr(II) formado.

Este método de preparação de espécies hidrolíticas de Cr(III) fornece uma mistura de espécies com predominância da dimérica; no entanto, a porcentagem de dímero formado é dependente de diversos fatores como: porcentagem de mercúrio na amálgama, altura da coluna de zinco, fluxo da solução pela coluna, tempo de borbulhamento de oxigênio, etc. Encontrou-se um bom rendimento para a espécie dimérica (aproximadamente 90%) empregando as seguintes condições:

- Zinco em pó amalgamado com 10% de mercúrio
- Fluxo da solução de perclorato de cromo pela coluna = 0.5 ml/min.
- Altura da coluna = 1.5 cm
- Diâmetro interno da coluna = 0.5 cm
- Oxigênio borbulhado por 15 minutos na solução efluente

Em uma série de experimentos empregando o método desenvolvido para colunas com microdiâmetro (coluna de 2 x 230 mm recheada com Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ , eluição com perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3, vazão de 0.2 ml/min, e detecção espectrofotométrica em 415 nm) verificou-se que:

- a- Se o pH da solução de perclorato de cromo a ser eluída pela coluna de zinco amalgamado era mantido baixo (pH = 1) havia formação preferencialmente de dímero; possivelmente formavam-se polímeros que não eram detectados.
- b- Se antes da eluição da solução de perclorato de cromo pela coluna de zinco amalgamado, o pH era aumentado para 3-4, através da adição de hidróxido de sódio, tinha-se uma polimerização nesta etapa e a amostra final não apresentava uma espécie em grande quantidade, mas sim, uma mistura contendo as espécies em quantidades semelhantes.
- c- Diminuindo-se a velocidade de vazão da solução através da coluna obtinha-se um ligeiro aumento na proporção de dímero. Para uma vazão de 1 ml/min obteve-se uma relação entre altura do pico do dímero e altura do pico do monômero de 38, enquanto que, para uma vazão de 0.5 ml/min esta relação foi de 44.

Como pode-se verificar, nos dois métodos de preparação de amostras é difícil obter-se uma boa reprodutibilidade devido ao grande número de variáveis envolvidas.

## **6.2 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando resinas de troca iônica**

### **6.2.1 Desenvolvimento do método do nitrato de cálcio**

Um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver um novo método de separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), para substituir o método anteriormente empregado neste laboratório.

Este método, denominado de "método convencional" (37,38) empregava colunas de vidro (0.5 x 6 cm) recheadas com resina AG 50W X-8, partículas de 106 a 250  $\mu\text{m}$ , e os seguintes eluentes:

ácido perclórico 4 mol/l - eluição do monômero  
ácido clorídrico 5 mol/l - eluição do dímero  
as espécies poliméricas ficam retidas na resina.

Em amostras onde Cr(VI) encontra-se presente, este pode ser eluído com ácido perclórico 0.01 mol/l. A Figura 6-1 mostra um exemplo da separação obtida com este procedimento. Empregou-se espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ ; o Apêndice C traz alguns detalhes sobre a detecção e sobre os cálculos empregados nestes experimentos. A denominação dos picos como sendo monômero e dímero visa apenas um melhor entendimento. Na verdade cada pico pode representar mais de uma espécie.

Este método não era adequado, visto que, separava um pequeno número de espécies, empregava reagentes caros (ácido perclórico), ou corrosivos para o sistema de detecção (ácido clorídrico), e também devido à suspeitas, depois confirmadas, de que o ácido clorídrico estivesse eluindo mais de uma espécie. Assim, tentou-se primeiramente, desenvolver um outro método simples, para ser usado na rotina do laboratório.

As primeiras tentativas foram feitas empregando a mesma resina e vários outros eluentes. A utilização de soluções de fosfato de sódio ou potássio, para eluição do dímero não mostrou bons resultados, devido a eluição simultânea do dímero e outras espécies de maneira similar ao ácido clorídrico. Nesta etapa, o monômero era eluído com ácido perclórico 4 mol/l.

Outros eluentes usados foram cloreto de cálcio (Figura

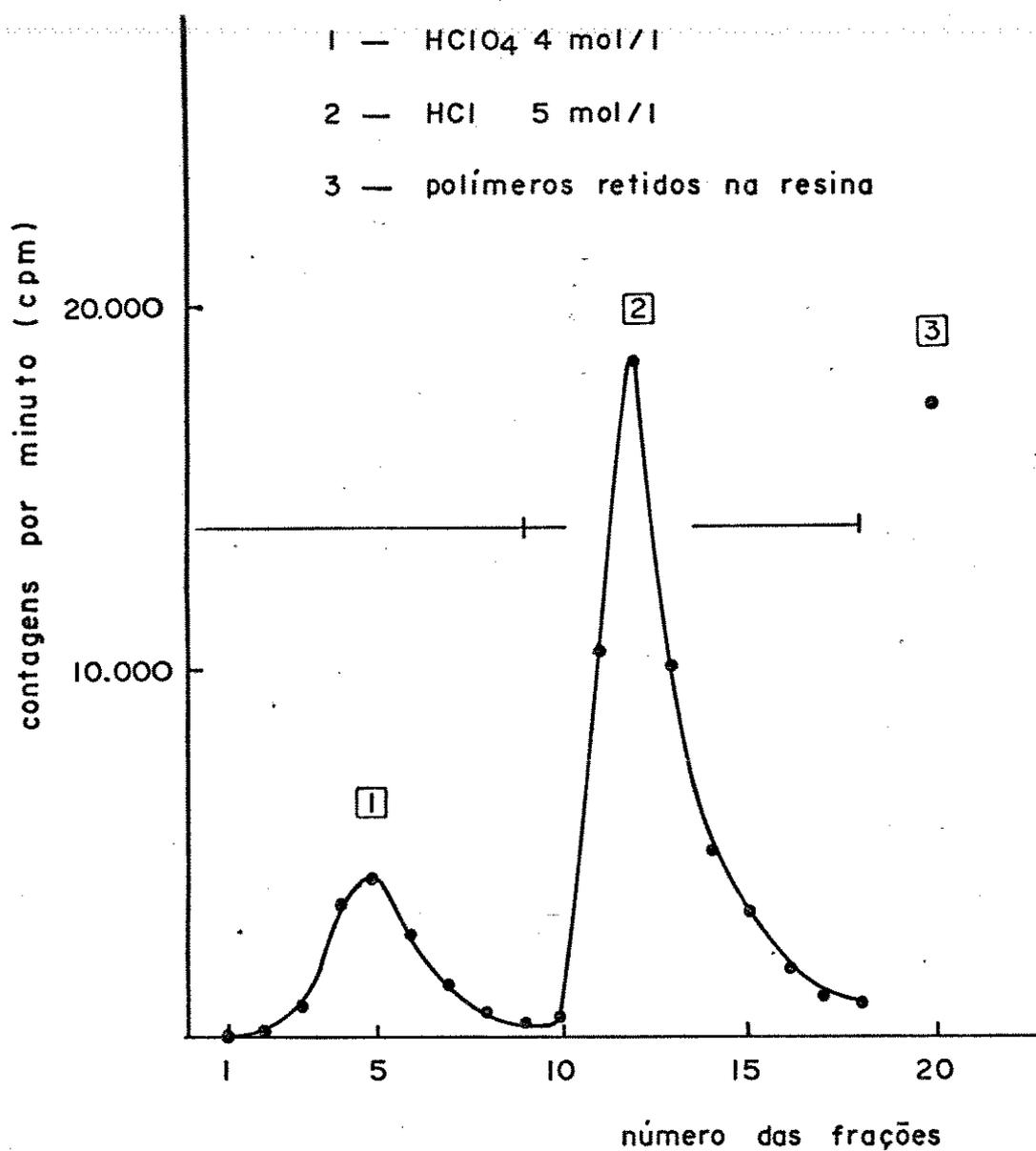


Figura 6.1 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método convencional.

Fase estacionária: AG 50W X-8, partículas de 106-250  $\mu\text{m}$ . Volume da amostra: 50  $\mu\text{l}$ . Volume das frações coletadas: 2 ml. Dimensões da colunas: 0.5 x 6 cm. Detec-  
tor de NaI(Tl).

6.2) e nitrato de cálcio, neste caso, empregados também para eluição do monômero. Nos dois casos notou-se que o monômero eluiu em uma banda simétrica, sem ocorrência de caudas. O cromatograma apresentava ainda dois outros picos, com caudas acentuadas. Parte da atividade injetada permanecia na resina após a análise.

Foram feitas várias tentativas para eliminação da cauda dos picos:

a- Mudança do pH

As análises iniciais foram feitas em  $\text{pH} = 2$  para evitar reações indesejáveis na amostra, como por exemplo, polimerização. O aumento do pH para 4 não resultou em melhores separações.

b- Mudança na quantidade de resina

Se estivesse ocorrendo uma reação entre as espécies na resina e isto acarretasse picos com caudas (140), uma diminuição nos tempos de permanência destas espécies na coluna poderia diminuir a cauda. Para verificar esta possibilidade, diminuiu-se a altura da coluna (6 para 4 cm) e verificou-se que além de não haver a eliminação da cauda dos picos, ocorria também uma perda na resolução.

c- Utilização de solventes orgânicos no eluente

Segundo Snyder (57) a presença de pequenas quantidades de solventes orgânicos polares, como por exemplo, metanol e etanol, no eluente, pode eliminar caudas em cromatografia por troca iônica. No entanto, a utilização de metanol 5 e 10% em soluções de

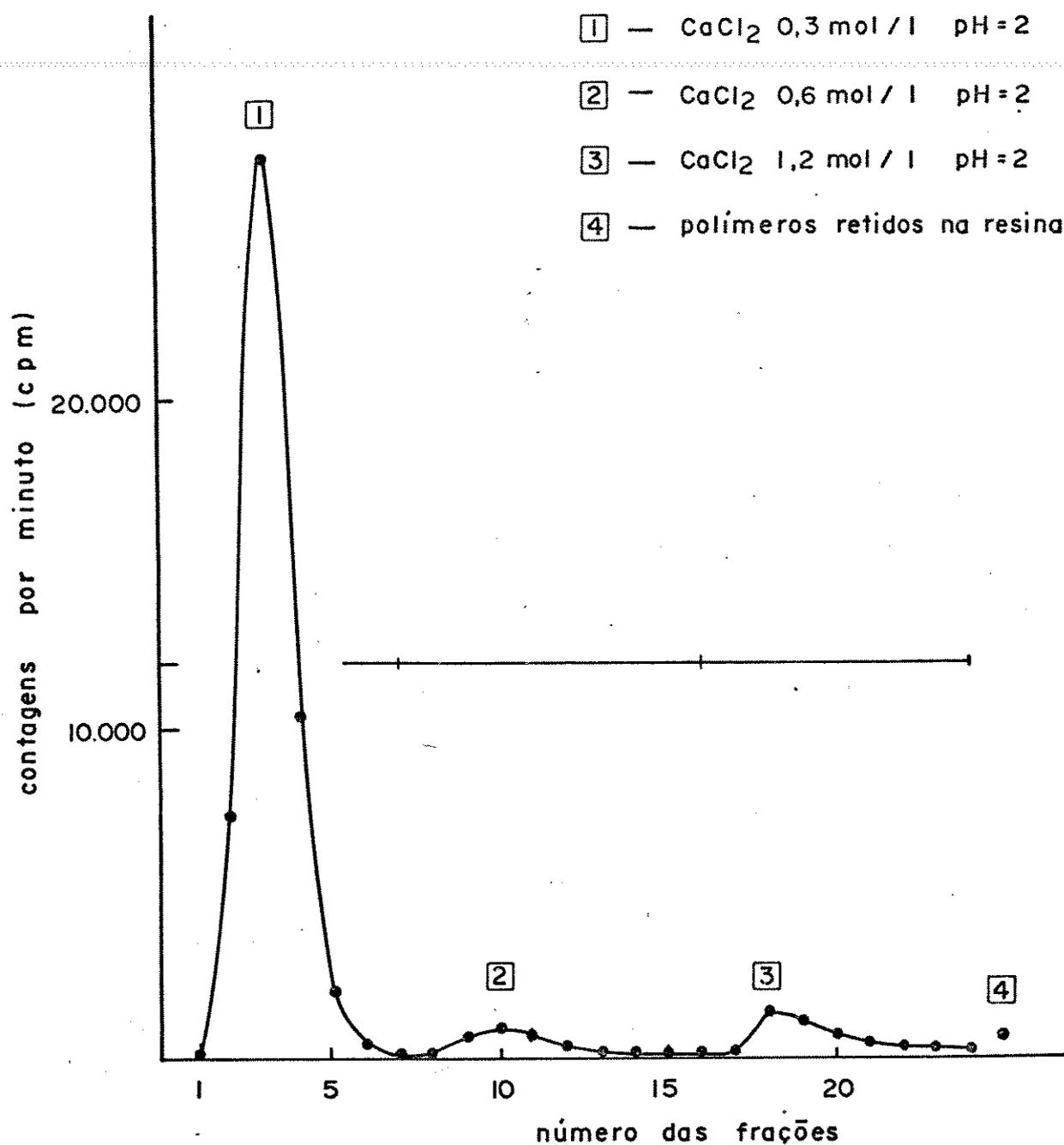


Figura 6.2 Eluição de espécies hidrolíticas de Cr(III) em resina AG 50W X-8, partículas de 106-250  $\mu\text{m}$ .

Volume da amostra: 50  $\mu\text{l}$ . Volume das frações coletadas: 3 ml. Dimensões da coluna: 0,5 x 6 cm. Detector de NaI(Tl).

cloreto de cálcio não diminuiu a cauda dos picos.

d- Mudança do eluente

Soluções de cloreto de lantânio, cloreto de bário e sulfato de potássio foram outros eluentes utilizados, mas as caudas persistiam e em alguns casos havia uma perda na resolução.

e- Utilização de resina com menor diâmetro de partícula

Com uma diminuição no tamanho das partículas, para aumentar a eficiência, verificou-se que a cauda dos picos era devido a eluição simultânea de duas ou mais espécies. A partir dessa observação passou-se a utilizar resina AG 50W X-4 com partículas de 38 a 75  $\mu\text{m}$ . O cloreto de cálcio foi substituído por nitrato de cálcio, para evitar reações de troca de água por cloreto na esfera de coordenação do cromo. A Figura 6.3 mostra a separação obtida com este método.

O primeiro, segundo e terceiro picos são considerados como sendo o monômero, dímero e trímero, respectivamente. O nitrato de lantânio elui duas espécies, provavelmente tetrâmero e pentâmero; a separação destas duas espécies, diminuindo-se a concentração do eluente tornou-se inviável porque além de não ocorrer a separação completa dos dois picos, havia um aumento muito grande no tempo de análise. A substituição do nitrato de cálcio e de lantânio, pelos respectivos percloratos, forneceu resultados similares. Houve apenas um ligeiro aumento nos tempos de retenção, relacionado com a concentração exata dos eluentes. A mudança nos tempos de retenção, devido à variações na concentração do

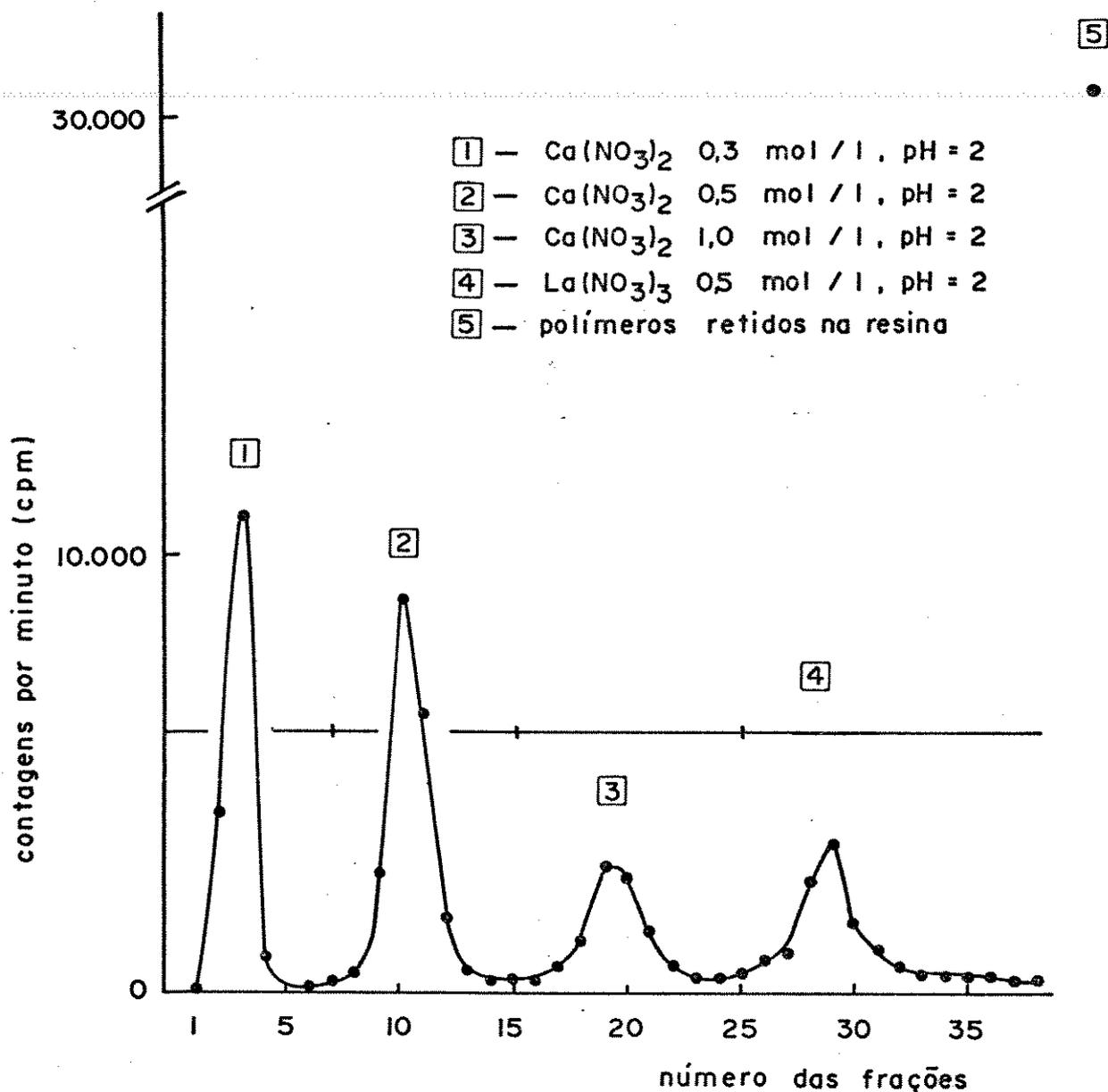


Figura 6.3 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método do nitrato de cálcio.

Fase estacionária: AG 50W X-4, partículas de 38-75  $\mu\text{m}$ .  
 Volume da amostra: 50  $\mu\text{l}$ . Volume das frações coletadas: 2 ml. Dimensões da coluna: 0,6 x 2 cm. Vazão da fase móvel: 0,5 ml/min. Detector de NaI(Tl).

eluente não é um problema muito sério, porque pode-se prepara-los em grandes quantidades, já que são de fácil estocagem, e efetuar uma análise teste para verificar os tempos de retenção exatos de cada espécie. A utilização de perclorato de cálcio e de lantânio é indicada para evitar reações de troca de ligantes nas espécies, no entanto, isto encarece o método. O pH dos eluentes foi mantido em 2 para evitar reações de polimerização da amostra.

A diminuição no diâmetro das partículas acarreta em uma maior resistência ao fluxo, tornando o tempo de análise muito longo. Para evitar este problema utilizou-se uma bomba peristáltica para impulsionar o solvente através da coluna. Este sistema é bastante adequado pois torna possível controlar a vazão em um determinado valor, e este valor será constante durante toda análise. O fluxo pulsante originado pela bomba não é um problema para este sistema tão simples.

O emprego de resinas com porcentagens diferentes de divinilbenzeno (8 ou 12%) mostrou resultados não satisfatórios, usando as mesmas condições de análise. Observou-se um aumento nos tempos de retenção a medida em que ocorria um aumento na porcentagem de divinilbenzeno. Isto acontece porque a capacidade por ml de resina hidratada aumenta com o aumento no grau de entrecruzamento, e este aumento na capacidade acarreta em um aumento nos tempos de retenção. A capacidade por ml de resina hidratada é de 1.2, 1.7 e 2.3 meq/ml para as resinas com 4, 8 e 12% de divinilbenzeno.

Verificou-se também uma perda na resolução e aparecimento de cauda nos picos, principalmente com a resina AG 50W X-12.

Após o método ter sido desenvolvido foi necessário verificar a estabilidade das espécies analisadas frente ao novo

eluente.

A estabilidade das espécies foi verificada em dois tipos de experimentos. Primeiramente fez-se a análise de uma amostra deixada por 90 minutos em presença de nitrato de cálcio 1 mol/l, pH = 2 (10  $\mu$ l da amostra + 0.5 ml do eluente) pelo método desenvolvido e pelo método convencional. A Tabela 6.1 mostra que a porcentagem das espécies permaneceram praticamente inalteradas durante a estocagem na presença do eluente.

Tabela 6.1 Estabilidade das espécies em presença de nitrato de cálcio.

	monômero(%)	dímero(%)	trímero(%)	polímeros(%)*
a	19.0	76.3	3.8	0.9
b	20.4	75.7	3.4	0.5
c	22.7	-	-	77.3 **

a- análise da amostra utilizando solução de nitrato de cálcio (dados da Figura 6.3, exceto quanto a utilização de nitrato de lantânio).

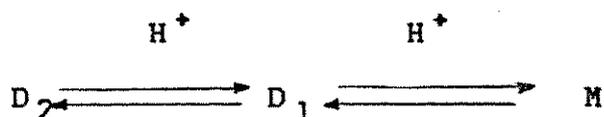
b- amostra estocada em nitrato de cálcio 1 mol/l, pH = 2 por 90 minutos e analisada como em "a".

c- amostra estocada em nitrato de cálcio 1 mol/l, pH = 2 por 90 minutos e analisada pelo método convencional.

\*- polímeros retidos na resina.

\*\*- dímero, trímero e outros polímeros retidos na resina.

Os resultados obtidos com o método convencional mostram um ligeiro aumento na quantidade de monômero devido a quebra do dímero em presença do ácido perclórico, de acordo com os dados da literatura (2,18) onde verificou-se o seguinte equilíbrio:



$D_2$  representa o dímero com duas pontes "OH" ligando os dois átomos de cromo,  $D_1$  representa o dímero com uma única ponte "OH" e M representa o monômero.

Em outro experimento, para verificar a estabilidade destas espécies em presença do eluente, efetuou-se o seguinte procedimento: após injeção da amostra na coluna, foi feita a eluição do monômero com nitrato de cálcio 0.3 mol/l pH = 2; a seguir, o restante das espécies foi deixada na coluna, por 90 minutos, em presença do eluente, e então, efetuou-se uma nova eluição com nitrato de cálcio 0.3 mol/l, pH = 2, para verificar se havia formação de monômero a partir do dímero ou de outros polímeros, dentro da coluna. Verificou-se que a porcentagem de monômero eluída na segunda vez foi de 0.1%, portanto desprezível. Este experimento serviu também, para verificar que não havia reações indesejáveis na resina, em tempos correspondentes a uma análise, que poderiam provocar uma mudança nas quantidades relativas das espécies.

Como já foi indicado anteriormente, havia suspeitas de que o ácido clorídrico, utilizado no método convencional, estivesse eluindo mais de uma espécie. Esta suposição foi verificada como sendo correta, analisando uma mesma amostra pelos dois métodos. O resultado para o dímero, obtido no método convencional foi

bem maior (61%) que o obtido com o método desenvolvido (17%).

### 6.2.2 Utilização do método do nitrato de cálcio no estudo da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III)

O método depois de desenvolvido, foi utilizado para a verificação da estabilidade de amostras preparadas segundo o método do redutor de Jones e o método da adição de hidróxido.

A Tabela 6.2 mostra os resultados obtidos em uma amostra onde à solução de perclorato de cromo, pH = 1 adicionou-se o cromo radioativo e a seguir efetuou-se o processo de redução/oxidação utilizando o redutor de Jones.

Tabela 6.2 Estabilidade de uma amostra contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem (pH  $\cong$  1).

tempo de estocagem(dias)	M (%)	D (%)	T (%)	P(resina) (%)
1	5.9	89.3	2.7	2.1
2	6.9	88.4	2.7	2.0
6	8.9	86.4	3.2	1.5
15	13.1	82.5	3.3	1.1
30	19.0	76.3	3.8	0.9

O tempo de estocagem leva a uma diminuição na porcentagem de dímero e aumento na de monômero. Estes resultados estão,

qualitativamente, de acordo com os dados de Thompson (2) e Stunzi (18), que propõem a clivagem do dímero em meio ácido. O pequeno aumento na porcentagem de trímero também pode ser explicado pela quebra de polímeros, como por exemplo, no caso do tetrâmero que resulta monômero e trímero (18).

O mesmo experimento, em outro tipo de amostra, onde o pH da solução de perclorato de cromo foi ajustado para 3 com hidróxido de sódio, antes da adição de  $^{51}\text{Cr(III)}$  e eluição pela coluna de zinco amalgamado, mostrou que havia polimerização a medida em que se aumentava o tempo de estocagem (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 Estabilidade de uma amostra contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem (pH  $\approx$  3).

tempo de estocagem(dias)	M (%)	D (%)	T (%)	P (resina)(%)
2	18.3	26.3	9.1	46.3
8	17.0	21.9	10.6	50.5
14	15.4	20.8	11.1	52.7
16	15.6	20.2	11.3	52.9

A Tabela 6.4 mostra a variação da porcentagem das espécies em uma amostra preparada segundo o método da adição de hidróxido, onde a 1 ml de uma solução de perclorato de cromo contendo  $^{51}\text{Cr(III)}$  adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de hidróxido de sódio 1 mol/l. Aqui também, a menor acidez (pH aproximadamente = 3) favorece a polimerização, tendo-se então uma diminuição na quantidade de monômero e aumento na quantidade das outras espécies, a medida em que o tempo de estocagem aumenta.

Tabela 6.4 Estabilidade de uma amostra preparada segundo o método da adição de hidróxido, em função do tempo de estocagem.

tempo de estocagem(dias)	M (%)	D (%)	T (%)	P(resina)(%)
1	76.2	7.7	3.6	12.5
7	72.5	7.9	5.2	14.4
8	71.9	8.0	5.7	14.4

Estes resultados indicam uma forte influência do pH da solução estocada, que pode favorecer a polimerização ou a quebra dos polímeros, resultando em espécies mais simples. Nestas amostras radioativas é difícil determinar o valor correto do pH, devido a não possibilidade de utilização do pHmetro, o que acarretaria em uma contaminação do eletrodo de vidro.

### 6.2.3 Utilização de resinas de troca catiônica em colunas de politetrafluoretileno

Resinas de troca catiônica foram utilizadas no enchimento de colunas de politetrafluoretileno (teflon), com as seguintes especificações:

coluna a - dimensões	1.5 x 500 mm
fase estacionária	AG 50W X-8, partículas de 38 a 63 $\mu$ m.
coluna b - dimensões	1.5 x 300 mm

fase estacionária	AG 50W X-4, partículas de 38 a 75 $\mu\text{m}$ .
coluna c - dimensões	1.5 x 300 mm
fase estacionária	AG 50W X-12, partículas de 38 a 63 $\mu\text{m}$ .

A finalidade destes experimentos era obter-se separações mais rápidas que no sistema anterior, e economizar eluentes e fase estacionária. Os eluentes empregados foram soluções de fosfato de sódio e nitrato de cálcio. As colunas foram utilizadas no sistema b1 descrito no Capítulo 5. Os resultados mostraram-se infrutíferos porque o volume de eluente necessário para eluição de um pico era muito grande, provocando um aumento na largura dos picos e conseqüente diminuição no limite de detecção. Além disso, o volume morto no sistema empregado, principalmente no detector, era muito grande, contribuindo ainda mais para uma maior largura nos picos (Figuras 6.4, 6.5 e 6.6). Novamente verificou-se um aumento nos tempos de retenção, quando aumentava-se o grau de entrecruzamento. O nitrato de cálcio, por ser um solvente mais forte, faz com que haja uma diminuição nos tempos de retenção das espécies (Figura 6.5).

Outro problema encontrado na utilização destas colunas foi o fato de que parte da amostra injetada ficava permanentemente retida pela fase estacionária. Isto foi comprovado injetando-se uma amostra com as espécies marcadas com <sup>51</sup>Cr. Após eluição de 3 picos coletou-se a resina em um tubo de contagem e verificou-se que grande parte da atividade injetada permanecia retida na resina. Sendo assim, foi desprezada a possibilidade de utilização destas resinas neste tipo de coluna.

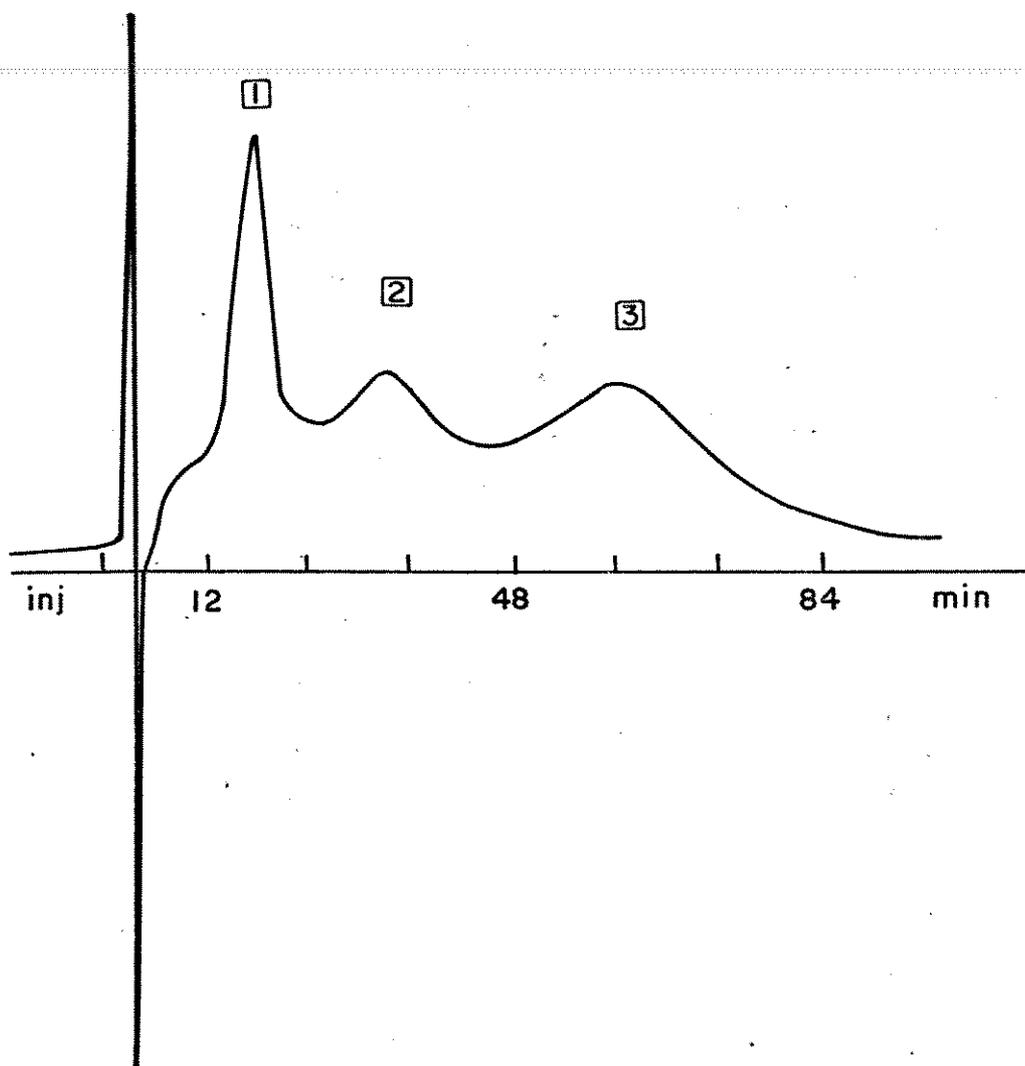


Figura 6.4 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando colunas de Teflon e fosfato de sódio como eluente.

Fase estacionária: AG 50W X-4, partículas de 38-75  $\mu\text{m}$ .  
Fase móvel: fosfato de sódio 0.8 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Dimensões da coluna: 1.5 x 300 mm. Volume da amostra: 20  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

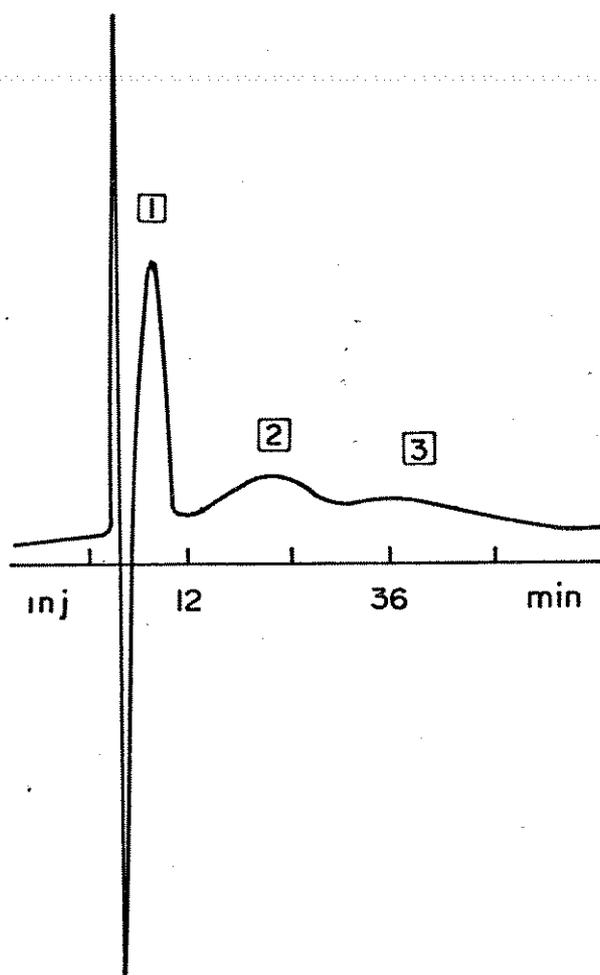


Figura 6.5 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando colunas de Teflon e nitrato de cálcio como eluente.

Fase estacionária: AG 50W X-4, partículas de 38-75  $\mu\text{m}$ .  
Dimensões da coluna: 1.5 x 300 cm. Fase móvel: nitrato de cálcio 0.7 mol/l, pH = 2. Vazão da fase móvel: 0.5 ml/min. Volume da amostra injetada: 20  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

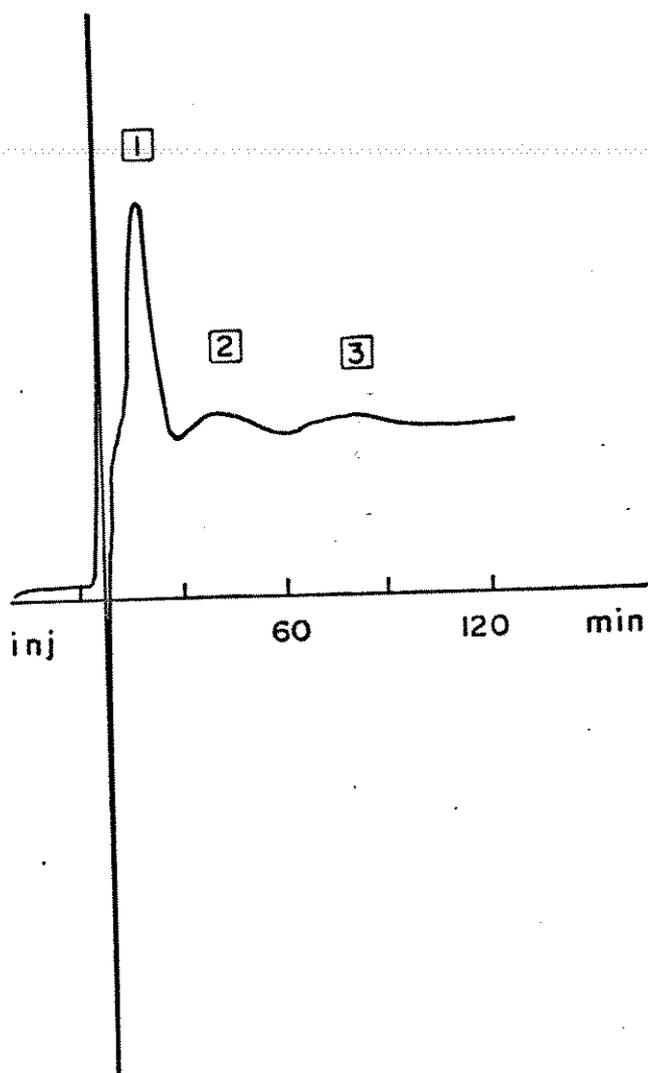


Figura 6.6 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) usando coluna de teflon recheada com resina AG 50W X-12, partículas de 38-63  $\mu\text{m}$ .

Dimensões da coluna: 1.5 x 300 mm. Fase móvel: fosfato de sódio 1 mol/l, pH = 2.8. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Volume da amostra injetada: 20  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

### 6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência empregando colunas de troca iônica

Esta etapa do projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um método rápido e mais sofisticado, para a separação de espécies hidrolíticas de Cr(III). Foram utilizadas as seguintes colunas:

coluna a	- dimensões	10 x 250 mm
	fase estacionária	Vydac cation SC, partículas de 30 - 44 $\mu$ m
coluna b	- dimensões	3.2 x 500 mm
	fase estacionária	Vydac cation SC, partículas de 30 - 44 $\mu$ m
coluna c	- dimensões	4.6 x 200 mm
	fase estacionária	Partisil 10SCX, partículas de 10 $\mu$ m

#### 6.3.1 Resultados obtidos com a coluna "a"

A fase estacionária desta coluna é do tipo pelicular, e portanto, de baixa capacidade; isto significa que pode-se injetar apenas quantidades reduzidas de amostras, porque caso contrário, ultrapassa-se a capacidade da coluna, e os picos apresentam caudas (140). Sendo assim, optou-se pelo emprego desta coluna de dimensões maiores, para se ter maior capacidade. A vantagem em se utilizar este tipo de fase estacionária com baixa capacidade é a possibilidade de eluição das espécies com solventes mais fracos.

No entanto, a eficiência destas colunas é baixa devido ao maior diâmetro das partículas.

Para os experimentos realizados com esta coluna empregou-se o sistema de cromatografia denominado b1 no Capítulo 5.

Primeiramente empregou-se soluções de fosfato de sódio e fosfato de potássio, pH = 3, devido às separações de monômero, dímero e polímeros obtidas por Farris (141), neste laboratório, empregando estes eluentes e colunas recheadas com Partisil 10SCX, partículas de 10  $\mu$ m. Foram obtidos resultados satisfatórios, como mostra a Figura 6.7, mas para tanto houve necessidade do emprego de gradiente, isto é, aumentar a concentração do solvente, durante a análise.

O primeiro pico do cromatograma possivelmente é Cr(VI) presente na amostra original, já que o perclorato de cromo utilizado para a produção das espécies hidrolíticas de Cr(III) foi obtido a partir da redução de dicromato de potássio. A cauda do quarto pico pode ser devido ao desvio da linha de base, em virtude do gradiente, ou devido a uma outra espécie sendo eluída.

A utilização de fosfato de sódio ou de potássio deve ser cuidadosa; em pH acima de 4 pode haver precipitação das espécies em presença do eluente, principalmente se as concentrações envolvidas forem relativamente altas (por exemplo, 1 mol/l). Deve-se lembrar também, que soluções de fosfato de sódio ou de potássio favorecem a proliferação de fungos quando estocada em temperatura ambiente.

Este método foi empregado para analisar uma amostra contendo espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  e mostrou-se adequado para a separação de espécies hidrolíticas de Cr(III), bem como de Cr(VI). Esta mesma amostra foi analisada empregando o método convencional, anteriormente usado neste laboratório, e novamente,

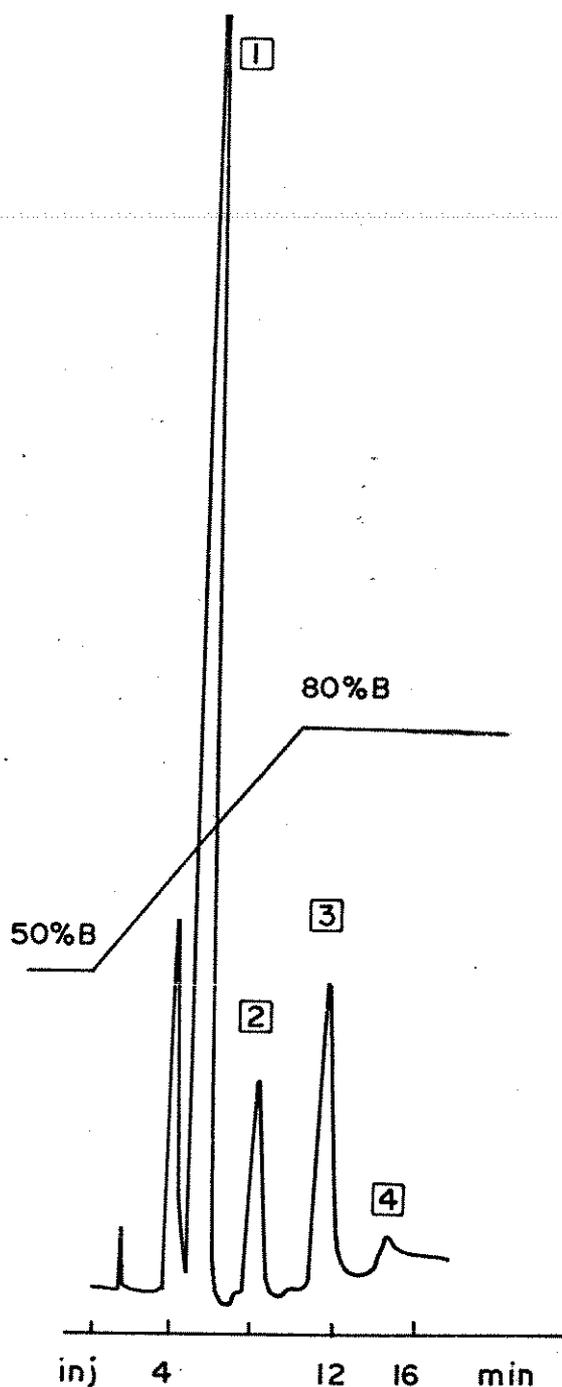


Figura 6.7 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44  $\mu\text{m}$ , e fosfato de sódio como eluente.

Dimensões da coluna: 10 x 250 mm. Fase móvel: fosfato de sódio 1 mol/l, pH = 3 (B) e água desionizada (A). Vazão da fase móvel: 2 ml/min. Volume da amostra injetada: 20  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

observou-se diferenças para os picos denominados como sendo o dímico. A Tabela 6.5 mostra os resultados obtidos, empregando os dois métodos.

Tabela 6.5 Distribuição das espécies hidrolíticas de Cr(III) (%), utilizando dois métodos de análise.

	número do pico			
	1	2	3	4
método CLAE	87.5	5.1	6.1	0.9
método convencional	85.3	11.2		3.0 *

\* atividade presente na resina

O primeiro pico do cromatograma (ver Figura 6.7) foi coletado e rendeu uma atividade de 0.4%. Resultado similar foi obtido com o método convencional, onde este pico foi eluído com ácido perclórico 0.01 mol/l. Os cálculos para o método CLAE foram feitos considerando que toda atividade injetada foi eluída; possíveis polímeros, embora presentes em pequenas quantidades nesta amostra (inferior a 3.0%), podem ter ficado retidos no topo da coluna. A utilização de um padrão para comparar a atividade presente em cada pico com a atividade total injetada não foi viável, devido a danos no injetor empregado.

Esta coluna também foi empregada com soluções de nitrato de cálcio como fase móvel. Aqui também, houve necessidade de utilização de gradiente para obter-se a separação de 5 espécies, embora com uma resolução inferior à desejada (Figura 6.8).

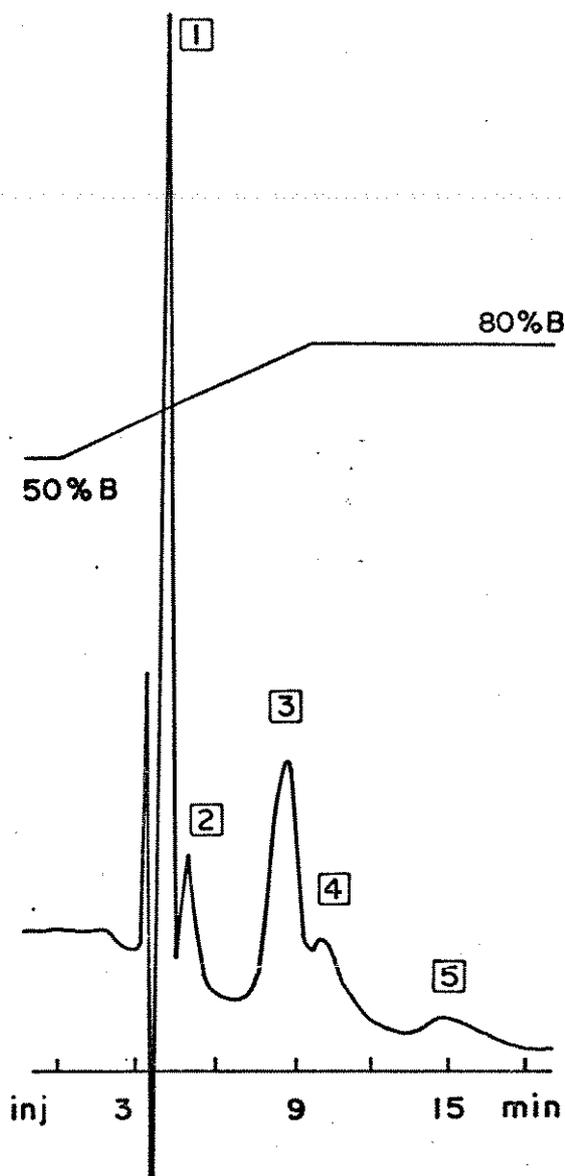


Figura 6.8 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44  $\mu\text{m}$  e nitrato de cálcio como eluente.

Dimensões da coluna: 10 x 250 mm. Fase móvel: nitrato de cálcio 1 mol/l, pH = 3 (B) e ácido nítrico, pH = 3 (A). Vazão da fase móvel: 2 ml/min. Volume da amostra injetada: 10  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

### 6.3.2 Resultados obtidos com a coluna "b"

Esta coluna foi utilizada no sistema de cromatografia denominado b2 no Capítulo 5. Soluções de fosfato de sódio ou de potássio não foram empregadas, apesar dos bons resultados obtidos com a coluna anterior, devido aos problemas de solubilização da amostra, já relacionados anteriormente. Neste sistema, onde emprega-se válvulas de injeção com amostrador interno de apenas 1 µl e conexões com volume interno muito reduzido, a presença de partículas acarretaria um problema muito mais sério.

Nitrato de cálcio foi substituído por perclorato de cálcio, pH = 3; apesar do eluente ser caro, as quantidades necessárias para eluição das espécies, empregando esta coluna, são muito menores que as utilizadas na coluna "a". Esta substituição, feita quando possível, visa evitar ao máximo a possibilidade de reações de troca de ligante entre as espécies e ânions presentes na fase móvel. Não foram obtidos resultados satisfatórios, tendo-se apenas a separação parcial de 4 picos (Figura 6.9)

O segundo eluente a ser utilizado foi perclorato de lantânio, também em pH = 3. Novamente observou-se a separação de 4 picos, muito embora a resolução não tenha sido adequada (Figura 6-10).

A utilização de eluição com gradiente também não resultou em separações adequadas, devido a baixa eficiência da coluna, portanto esta coluna foi desprezada.

### 6.3.3 Resultados obtidos com a coluna "c"

Esta coluna foi preparada em nosso laboratório empre-

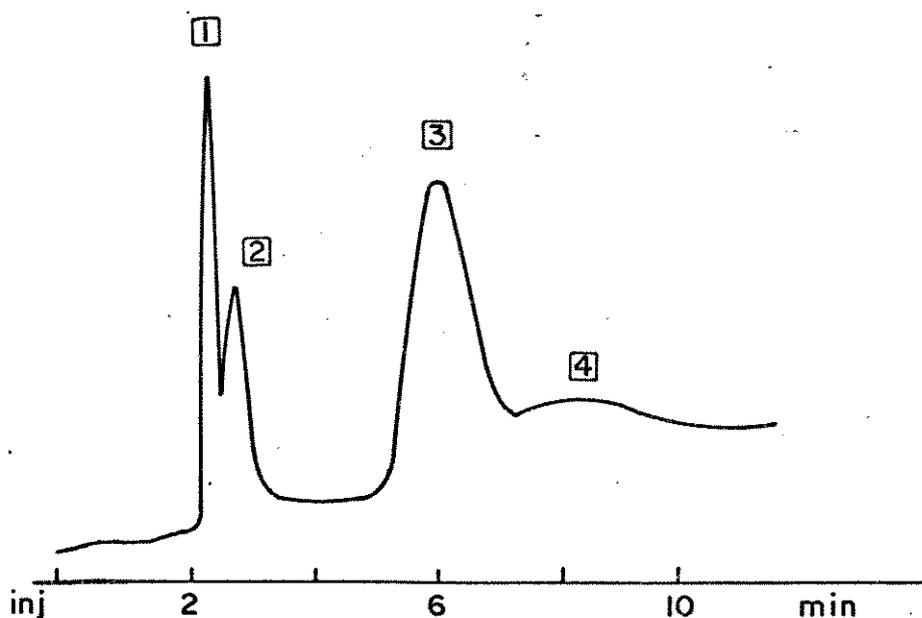


Figura 6.9 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando coluna recheada com Vydac SC cation, partículas de 30-44  $\mu\text{m}$  e perclorato de cálcio como eluente.

Dimensões da coluna: 3.2 x 500 mm. Fase móvel: perclorato de cálcio 0.4 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.5 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

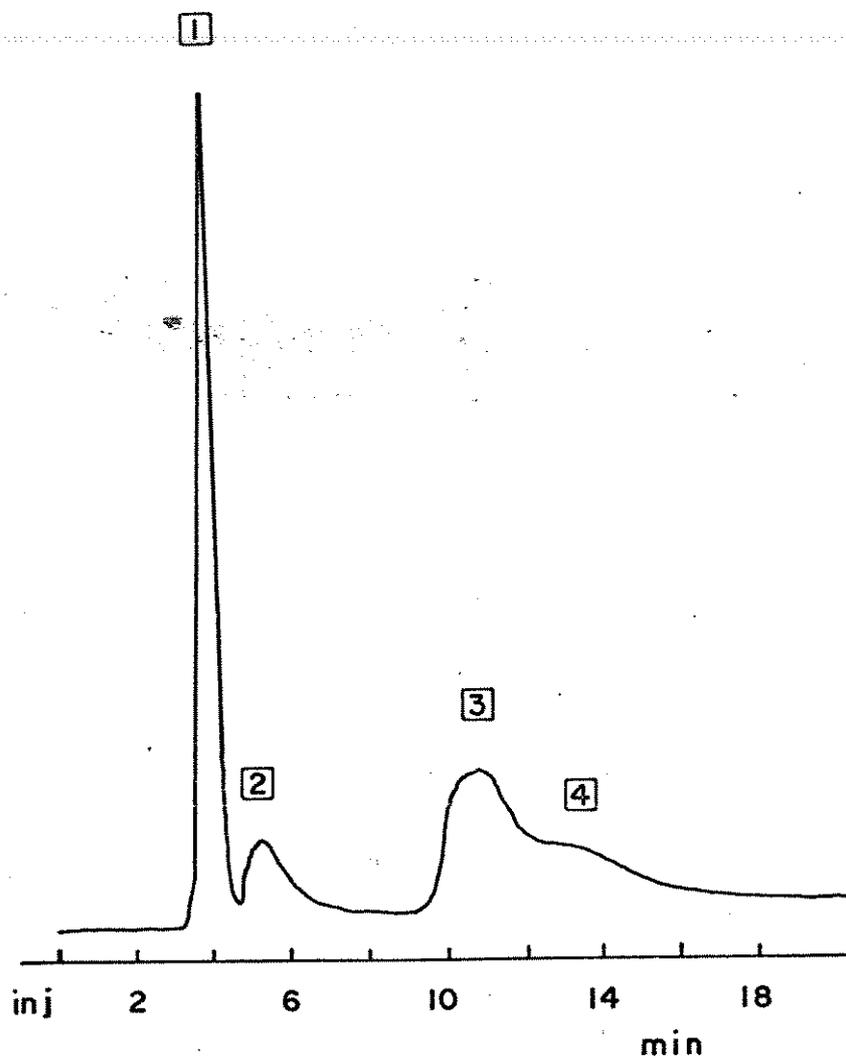


Figura 6.10 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando perclorato de lantânio como eluente.

Fase estacionária: Vydac SC cation, partículas de 30-44  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 3.2 x 500 mm. Fase móvel: perclorato de lantânio 0.05 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.5 ml/min. Volume da amostra injetada: 10  $\mu\text{l}$  (neste caso, utilizou-se o injetor do sistema bi). Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

gando a bomba de alta pressão citada no Capítulo 5.

A literatura é pouco clara a respeito dos métodos empregados no enchimento de colunas com fase estacionária de troca iônica baseada em sílica. Trabalhos sobre técnicas de enchimento de colunas são feitos, preferencialmente, com fase reversa ou fase normal, visto que, este tipo de fase estacionária fornece colunas de maior eficiência do que aquelas recheadas com fase estacionária de troca iônica.

Os métodos citados na literatura empregam solventes orgânicos (85) ou a própria fase móvel que vai ser empregada na análise (91), para preparar a suspensão e efetuar o enchimento.

Neste trabalho, optou-se pela utilização de soluções de perclorato de cálcio, baseados em resultados obtidos com colunas de menor diâmetro interno, onde a utilização de solventes orgânicos resultou em colunas que apresentavam vazios após condicionamento com água ou com a fase móvel, como será discutido posteriormente.

A suspensão, antes de ser introduzida na coluna, foi deixada em repouso por 30 minutos, para que não houvesse problemas de contração do recheio como ocorre com resinas, onde a troca do contra-íon por outro de maior carga causa contração do recheio. Imediatamente antes de se efetuar o enchimento, a suspensão foi submetida ao ultra-som por 5 minutos, para efetuar uma perfeita homogeneização e para eliminar gases dissolvidos. Após esta etapa, a suspensão foi transferida rapidamente para o reservatório da bomba e efetuou-se o enchimento da coluna a uma pressão de  $350 \text{ kg/cm}^2$ , empregando a mesma solução usada no preparo da suspensão. Esta transferência rápida da suspensão do ultra-som para o reservatório visa minimizar a sedimentação das partículas.

A coluna depois de pronta foi condicionada com água e a

fase móvel (nitrato de cálcio), não verificando-se qualquer vazão no topo. Os testes com esta coluna foram feitos empregando o sistema bi de cromatografia.

Optou-se pela utilização de nitrato de cálcio como fase móvel por não haver problemas de solubilização da amostra, por ser de baixo custo, de fácil preparação e estocagem, o que não acontece com soluções de fosfato de sódio ou potássio, onde ocorre a proliferação rápida de fungos, quando estocadas a temperatura ambiente.

Com esta coluna obteve-se a separação de cinco picos, como indicado na Figura 6.11. A primeira deflexão observada no cromatograma está relacionada com o ato de injeção, devido a danos no injetor utilizado. Não houve necessidade do emprego de eluição com gradiente para a separação destes cinco picos, o que representa uma grande vantagem, já que não há necessidade de regenerar a coluna entre uma análise e outra, e não há problemas de desvios da linha de base. A utilização de eluentes em pH = 3 está relacionada com a estabilidade da fase estacionária e minimização de reações na amostra.

Foi observada a presença de polímeros fortemente retidos no topo da coluna, devido a um depósito verde observado após algum tempo de uso da coluna. Este depósito não havia sido observado anteriormente, provavelmente porque a quantidade de polímeros presentes nas amostras injetadas nas outras colunas era muito pequena. É aconselhável a utilização de uma pré-coluna entre o injetor e a coluna, para evitar esta retenção irreversível que inutiliza a coluna após algum tempo de uso. No entanto, deve-se minimizar o volume morto nas conexões, para evitar uma perda exagerada na eficiência.

Uma solução de perclorato de cromo (monômero) foi em-

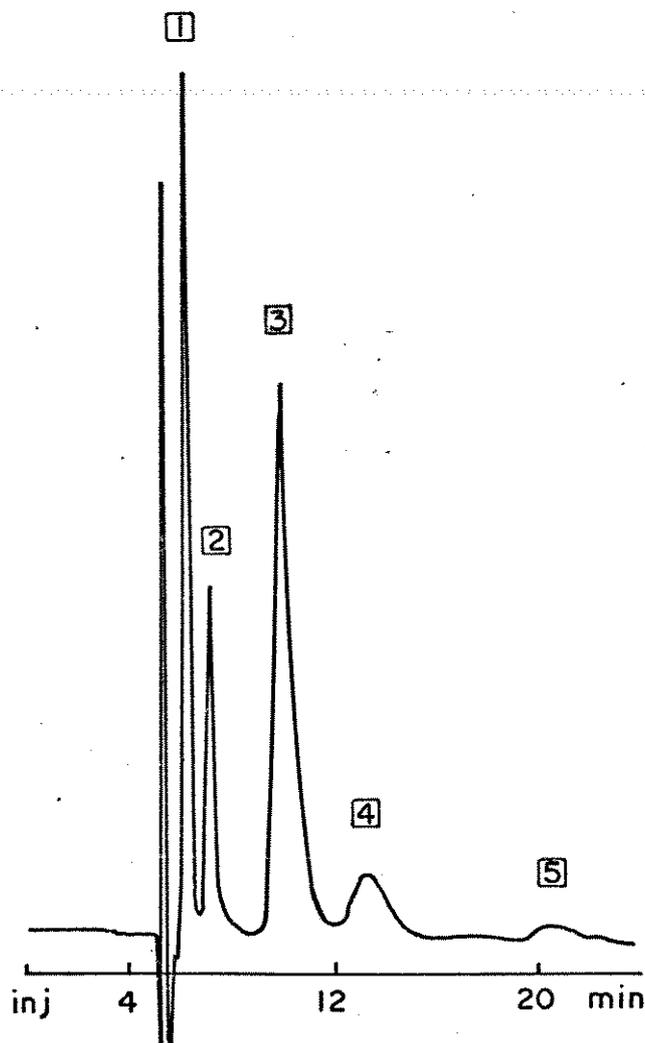


Figura 6.11 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando uma coluna recheada com Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ .

Dimensões da coluna: 4.6 x 200 mm. Fase móvel: nitrato de cálcio 0.2 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.5 ml/min. Volume da amostra injetada: 10  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

pregada na determinação da eficiência desta coluna, utilizando o método citado no Apêndice A. Os valores mostrados na Figura 6.12, onde obteve-se uma eficiência máxima de 20000 pratos teóricos por metro de coluna, estão de acordo com os melhores valores indicados na literatura. O fabricante desta fase estacionária (Whatman) indica valores aproximados de eficiência para as colunas obtidas.

Esta coluna foi empregada na verificação da influência do pH da fase móvel na separação. A Figura 6.13 mostra que essa influência é bastante significativa. Um aumento no pH acarreta em uma diminuição nos tempos de retenção, fazendo com que haja uma perda na resolução. Para análises posteriores optou-se pelo pH = 3 que fornece uma separação adequada e está dentro da faixa de uso deste tipo de fase estacionária ( 2 - 7.5).

#### 6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência empregando colunas com microdiâmetro

Atualmente, tem-se dado grande ênfase à miniaturização do sistema de cromatografia líquida, com o emprego de colunas cada vez menores, quer seja no comprimento, ou no diâmetro interno, nas chamadas colunas com microdiâmetro.

Colunas com microdiâmetro têm a grande vantagem na redução, bastante significativa, do consumo de fase estacionária e fase móvel, tornando possível a utilização de materiais mais sofisticados para obter-se separações não conseguidas anteriormente. Entretanto, este tipo de cromatografia exige um sistema onde o volume morto seja mínimo. Volume morto excessivo entre injetor e coluna, entre coluna e detector, e principalmente, na cela do detector acarreta em uma perda na eficiência; outra exigência

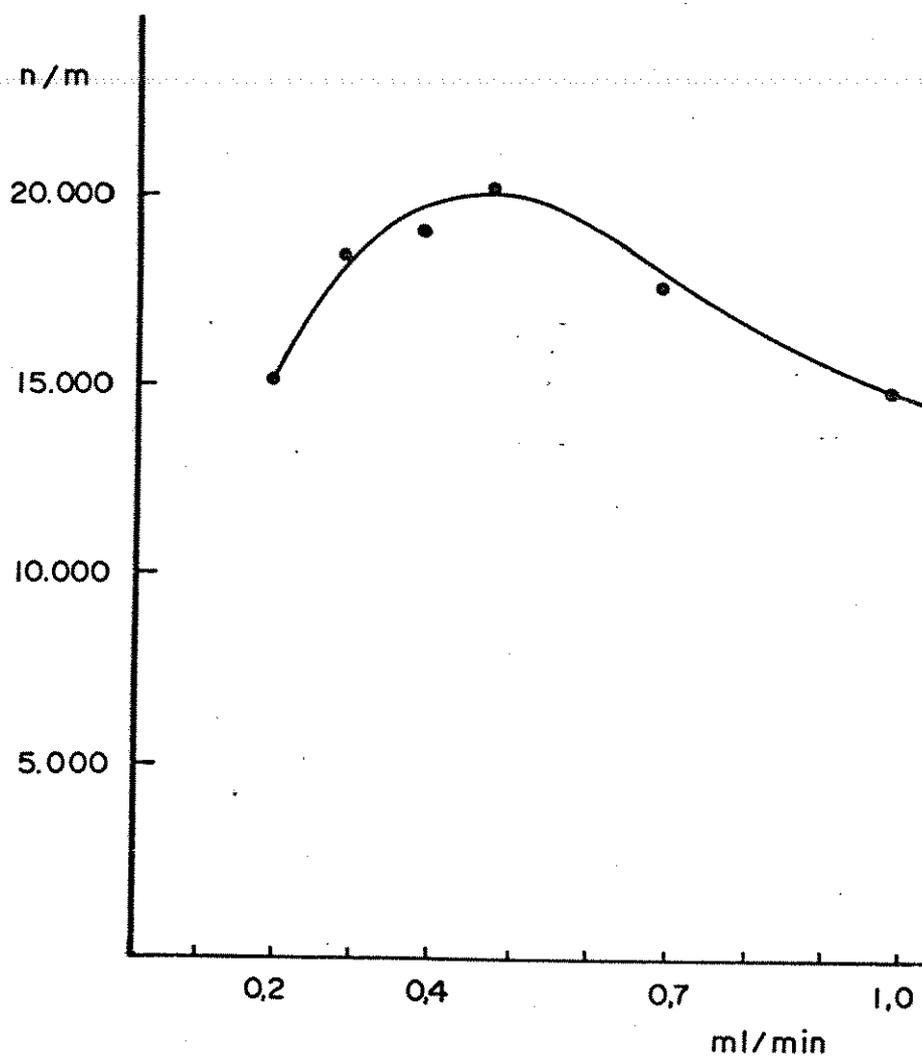


Figura 6.12 Eficiência (n/m) em função da vazão da fase móvel (ml/min) obtida para a coluna "c".

Fase móvel: nitrato de cálcio 0.15 mol/l, pH = 3.  
Solute: Solução de perclorato de cromo 0.1 mol/l (monômero).

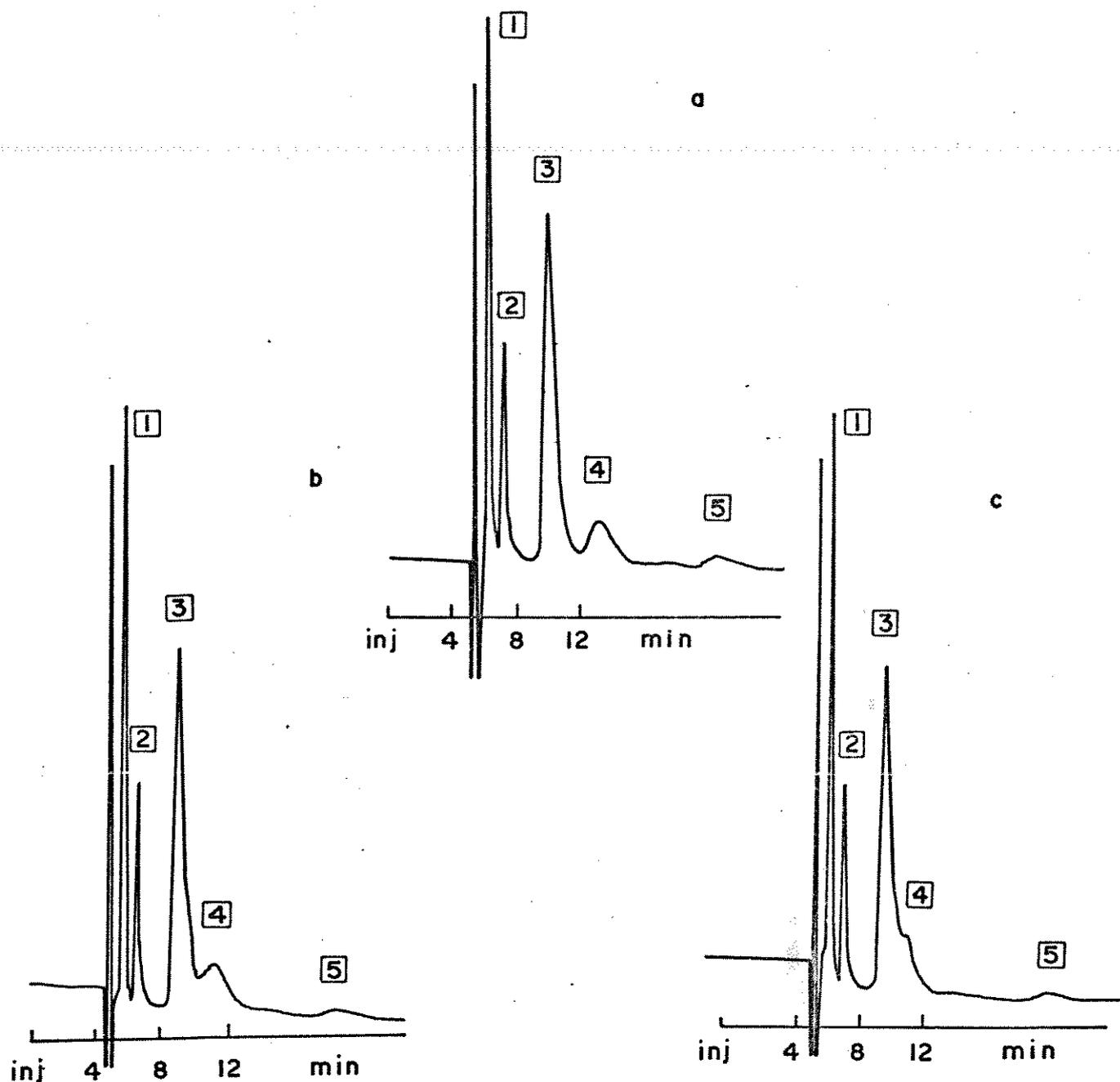


Figura 6.13 Influência do pH da fase móvel na separação de espécies hidrolíticas de Cr(III).

Coluna "c". Fase móvel: nitrato de cálcio 0.2 mol/l ( a- pH = 3, b- pH = 3.3, c- pH = 3.8). Vazão da fase móvel: 0.5 ml/min. Volume da amostra injetada: 10  $\mu$ l. Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

deste sistema é a utilização de uma bomba capaz de gerar vazões mínimas, inferiores a 0.1 ml/min.

Visando economia de fase estacionária e fase móvel, tentou-se desenvolver um método empregando colunas com diâmetro interno de 1 e 2 mm, recheadas com Partisil 10SCX, partículas de 10 um. Nestes experimentos foi empregado o sistema b2 descrito no Capítulo 5, onde procurou-se minimizar o volume morto entre a coluna e injetor e entre coluna e detector. O injetor utilizado tornou possível a injeção de pequenas quantidades de amostra (1 ul), para não ultrapassar a capacidade da coluna. O detector usado, com cela de 1 ul, também visava a eliminação de volume morto. A bomba disponível fornece vazões mínimas de 0.1 ml/min. Este valor é muito alto para as colunas com 1 mm de diâmetro interno, mas ela foi utilizada mesmo assim, porque não houve possibilidade de obtenção de outra mais adequada.

#### 6.4.1 Colunas de 1 mm de diâmetro interno

Como já foi indicado no Capítulo 5, para o enchimento destas colunas empregou-se um reservatório com um volume de 3 ml e um restritor cônico, para reduzir o diâmetro interno de 4.6 para 1 mm. Foram recheadas várias colunas de 250 mm de comprimento, usando metanol ou isopropanol como agente suspensor e metanol para efetuar o enchimento. Este método não foi adequado pois após as colunas terem sido condicionadas com a fase móvel (soluções de perclorato de cálcio), apresentavam um vazio no topo, devido a contração do recheio. Esta contração podia ser devido a um problema mecânico do enchimento, relacionado com a configuração das conexões entre a coluna e reservatório, que poderia estar impedindo um fluxo homogêneo do recheio para dentro da coluna, ou po-

dia ser devido a uma contração da fase estacionária quando esta passava da forma  $H^+$  para a forma  $Ca^{2+}$ . Este fato é bem observado quando utiliza-se resina de troca iônica, mas na literatura não há nada especificado a respeito de fases estacionárias baseadas em sílica, como é o caso de Partisil 10SCX.

Para verificar qual dos dois fatores estava provocando os vazios, recheou-se uma coluna de 250 mm empregando metanol como agente suspensor e para efetuar o enchimento. Após o enchimento da coluna fez-se o seu condicionamento com água, e novamente, verificou-se o vazio no topo.

Em outro experimento passou-se a utilizar perclorato de cálcio 0.1 mol/l, pH = 3 como agente suspensor (fase estacionária em presença da solução por 30 minutos) e também no enchimento; o vazio no topo da coluna, verificado neste caso, após condicionamento com água foi menor que nas vezes anteriores.

Baseados também em resultados obtidos com colunas de 2 mm de diâmetro interno, onde verificou-se vazios quando o enchimento era feito com metanol, e colunas perfeitas em enchimentos com perclorato de cálcio, conclui-se que os dois fatores poderiam estar influenciando a deficiência no enchimento e que o problema causado pela configuração do sistema foi eliminado no caso das colunas de 2 mm de diâmetro interno.

A literatura sugere a utilização de pressões acima de  $1000 \text{ kg/cm}^2$ , para o enchimento destas colunas. A bomba disponível em nosso laboratório opera em pressões máximas de  $500 \text{ kg/cm}^2$ , portanto, isto também poderia estar afetando o enchimento deficiente, no caso de colunas de 1 mm de diâmetro interno.

Foram utilizadas duas colunas de 1 x 250 mm recheadas com Partisil 10SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . As condições de enchimento das colunas são mostradas na Tabela 6.6.

Tabela 6.6 Condições de enchimento de colunas de 1 x 250 mm

coluna	solvente para a suspensão	solvente para efetuar o enchimento	pressão (kg/cm <sup>2</sup> )
1a	metanol	50 ml de metanol	500
1b	perclorato de cálcio 0.1 mol/l pH = 3	20 ml de perclorato de cálcio 0.1 mol/l pH = 3	500

Nos dois casos foi utilizado o mesmo reservatório de 3 ml com restritor cônico e a suspensão submetida ao ultra-som por 5 minutos, antes do enchimento. As duas colunas apresentaram vazios após condicionamento com água, sendo que este vazio foi mais acentuado na coluna 1a; estes vazios foram preenchidos com novas quantidades de fase estacionária, utilizando o mesmo reservatório e a bomba do cromatógrafo para impulsionar a suspensão para dentro da coluna, a pressões de 200 kg/cm<sup>2</sup>.

As Figuras 6.14 e 6.15 mostram os resultados obtidos com a coluna 1a, empregando soluções de perclorato de cálcio e de lantânio como eluentes. Soluções de fosfato de sódio ou de potássio não foram empregadas, devido aos problemas de precipitação já relacionados. A diferença entre altura de picos está relacionada com a diferença nas duas amostras injetadas. Nos dois casos tem-se apenas a separação parcial de 4 picos; há evidências de mais espécies devido as caudas nos picos.

Resultados similares foram obtidos empregando a coluna

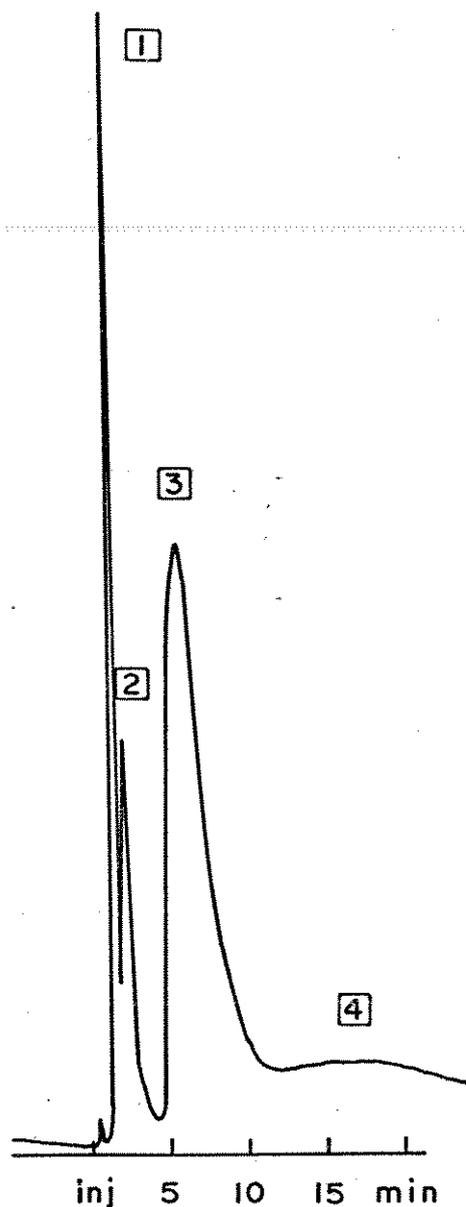


Figura 6.14 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1a e perclorato de cálcio como eluente.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 1 x 250 mm. Fase móvel: perclorato de cálcio 0.15 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.1 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

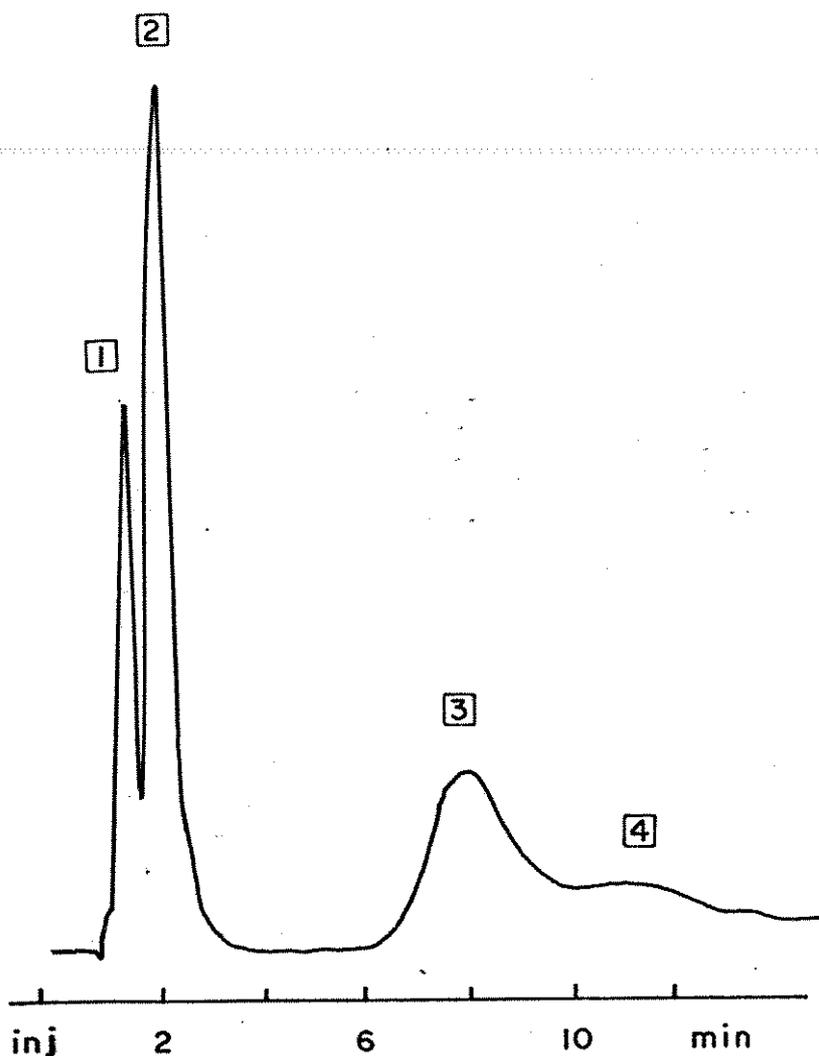


Figura 6.15 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1a e perclorato de lantânio como eluente.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 1 x 250 mm. Fase móvel: perclorato de lantânio 0.02 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.1 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

1b, com os mesmos eluentes, como está indicado na Figura 6.16.

Não prosseguiu-se com o estudo deste tipo de colunas, visto que, não conseguiu-se uma boa separação. A eficiência destas colunas foi muito baixa (aproximadamente 900 pratos por metro de coluna) devido aos problemas no enchimento, já relacionados, e a vazão excessivamente alta obtida com a bomba empregada nas análises (0.1 ml/min). A utilização de colunas de maior comprimento (500 mm), para aumentar a eficiência, tornou-se inviável devido a alta pressão obtida nesta vazão limite.

#### 6.4.2 Colunas de 2 mm de diâmetro interno

O enchimento destas colunas foi feito empregando soluções de perclorato de cálcio 0.1 mol/l, pH = 3, como agente suspensor e como solvente para efetuar o enchimento. Quando empregou-se metanol para efetuar o enchimento obteve-se colunas que apresentavam vazios após condicionamento com água.

Para o enchimento de duas colunas de 230 x 2 mm (2a) e 250 x 2 mm (2b) empregou-se as mesmas condições já descritas, isto é, suspensão submetida ao ultra-som por 5 minutos, enchimentos empregando 50 ml de perclorato de cálcio 0.1 mol/l, pH = 3, a pressões de 350 kg/cm<sup>2</sup>, limitada pela resistência das conexões entre a bomba e o reservatório e entre este e a coluna. Estas colunas não apresentaram vazios após utilização com soluções de perclorato de cálcio ou de lantânio.

As Figuras 6.17 a 6.19 mostram as separações obtidas com as duas colunas; verifica-se a separação de 4 espécies.

A coluna 2b foi utilizada na análise de uma amostra contendo espécies marcadas com <sup>51</sup>Cr, preparada segundo o método do redutor de Jones. Verificou-se 4 picos de atividade coinciden-

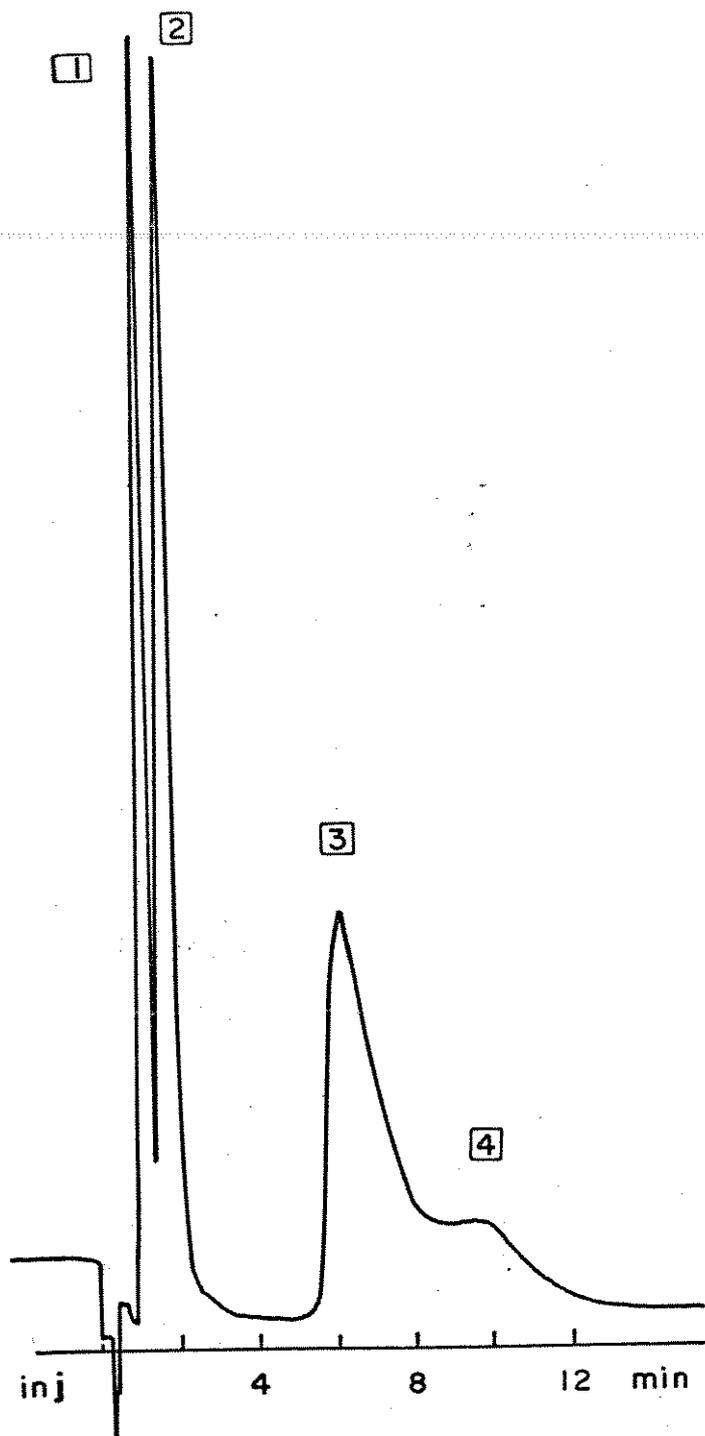


Figura 6.16 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 1b.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 1 x 250 mm. Fase móvel: perclorato de cálcio 0.15 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.1 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

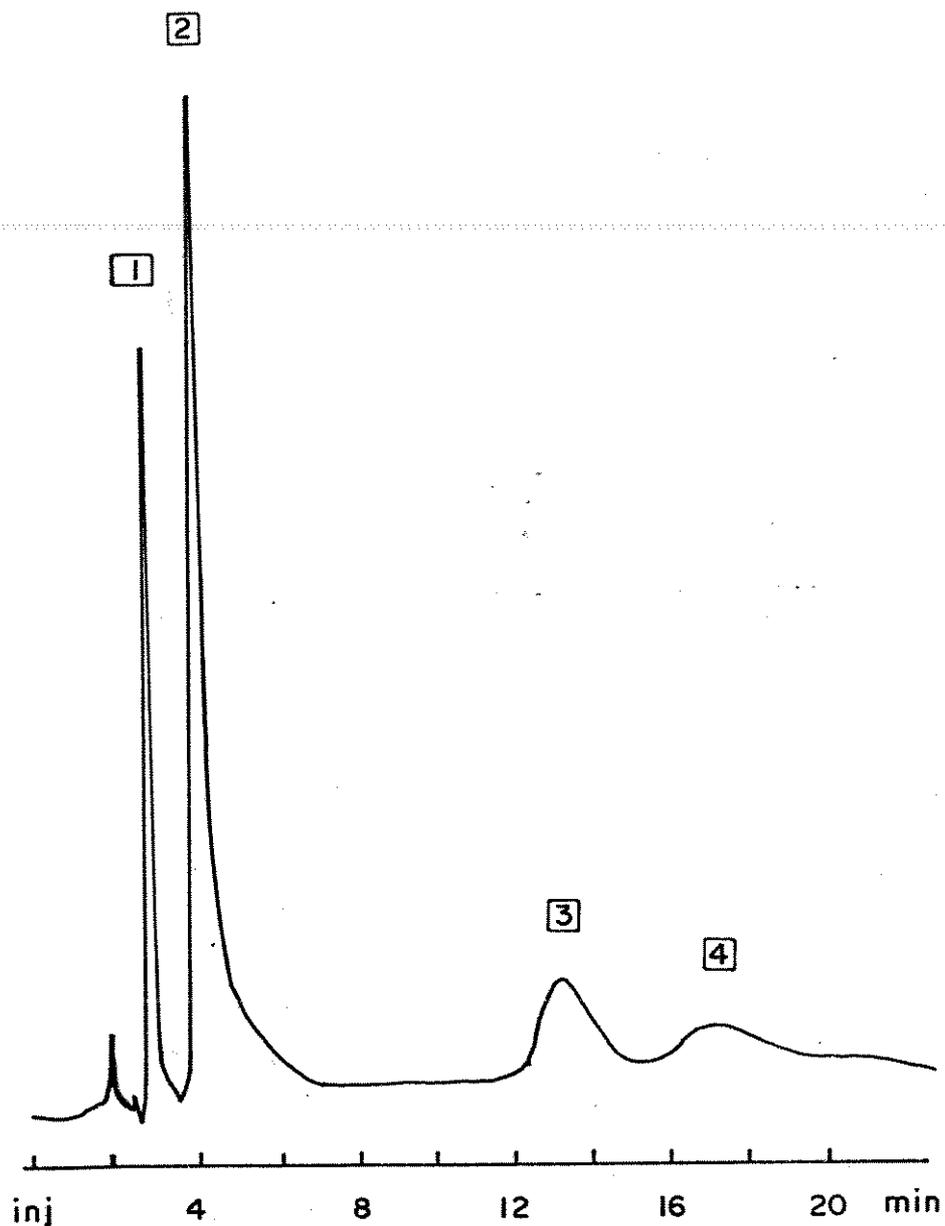


Figura 6.17 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2a e perclorato de cálcio como eluente.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 2 x 230 mm. Fase móvel: perclorato de cálcio 0.15 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

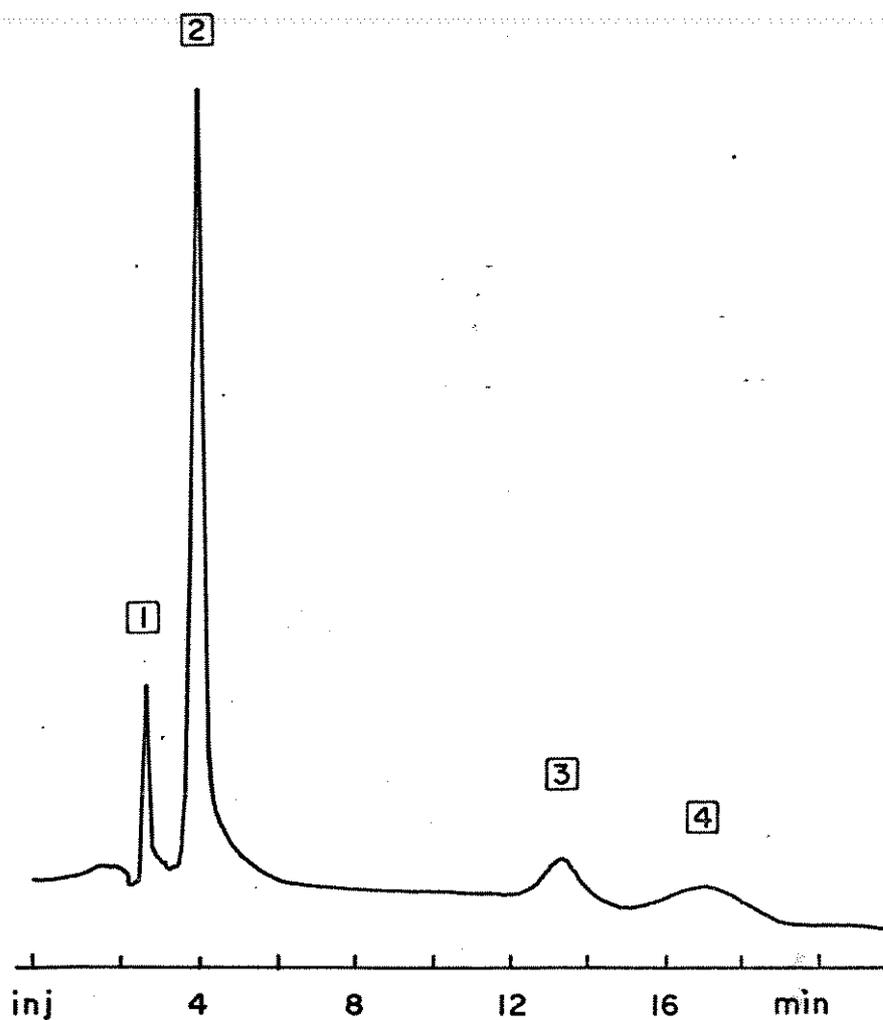


Figura 6.18 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2a e perclorato de lantânio como eluente.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 2 x 230 mm. Fase móvel: perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . detecção espectrofotométrica em 415 nm.

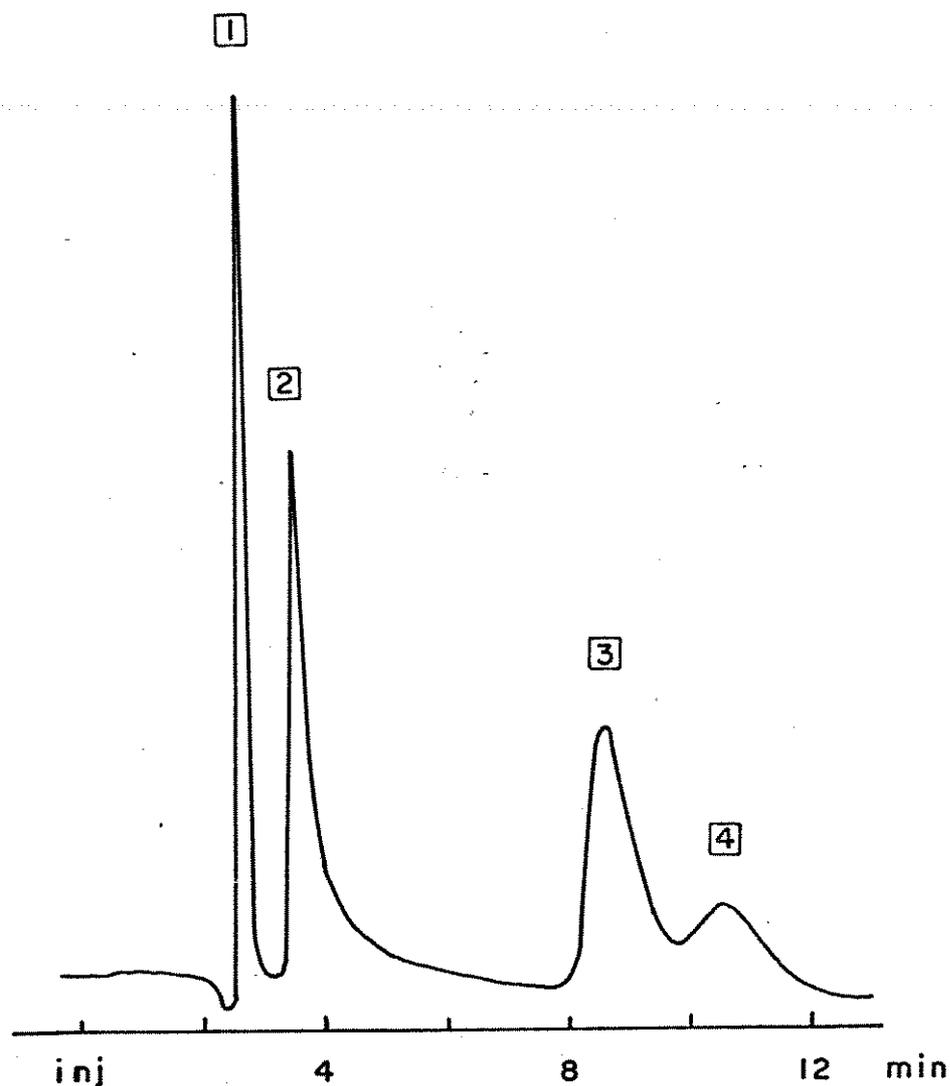


Figura 6.19 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando a coluna 2b e perclorato de lantânio como eluente.

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 2 x 250 mm. Fase móvel: perclorato de lantânio 0.05 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Detecção espectrofotométrica em 415 nm.

tes com 4 picos detectados empregando o detector por absorção no visível, em 415 nm (figura 6.20). Verificou-se também que o último pico apresentava uma cauda, devido a polímeros retidos fortemente pela fase estacionária. Os cálculos, feitos em comparação com a atividade presente em um padrão, mostraram que grande parte da atividade presente na amostra original não foi eluída nos 4 picos de atividade.

Tabela 6.7 Análise de uma amostra contendo espécies hidrolíticas de Cr(III) marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , empregando colunas de 2 mm de diâmetro interno.

número do pico	porcentagem de atividade
1	13.6
2	22.6
3	6.8
4	9.1

Outro fato que evidenciou a retenção de polímeros na fase estacionária foi a presença de um depósito verde no topo da coluna após utilização por vários dias. Esta retenção provoca a inutilização da coluna após algum tempo de uso. A utilização de uma pré-coluna entre o injetor e a coluna é inviável neste sistema, pois isto ocasionaria um volume morto muito grande, o que diminuiria bastante a eficiência das colunas.

A Figura 6.21 mostra a eficiência de colunas de 2 mm de diâmetro interno (n/m), em função da vazão da fase móvel; os cálculos foram feitos baseados na largura e na distância de reten-

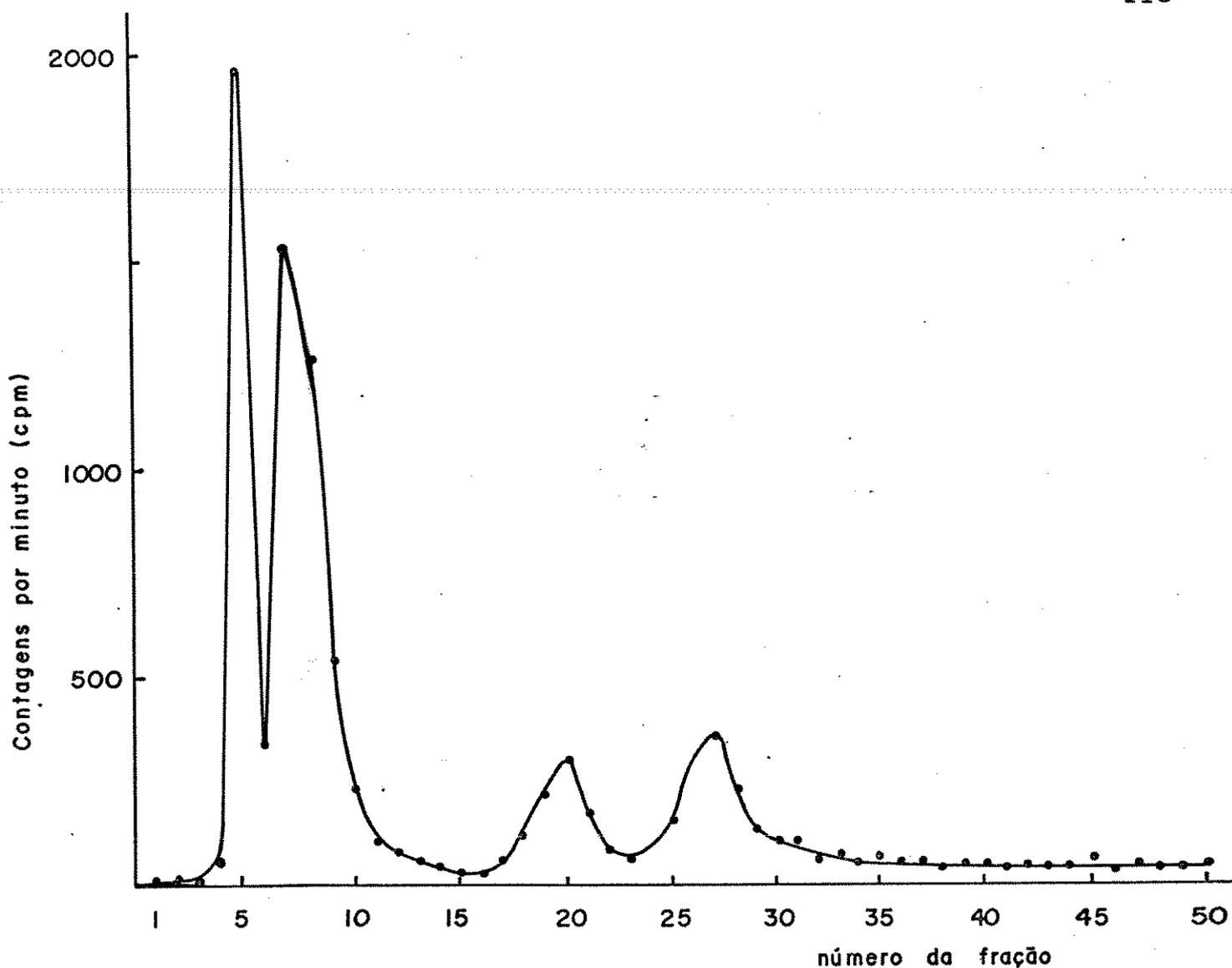


Figura 6.20 Radiocromatograma de uma mistura de espécies hidrolíticas de Cr(III), marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ .

Fase estacionária: Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 2 x 250 mm. Fase móvel: perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3. Vazão da fase móvel: 0.2 ml/min. Volume da amostra injetada: 1  $\mu\text{l}$ . Volume das frações coletadas: 5 gotas. Detector de NaI (Tl).

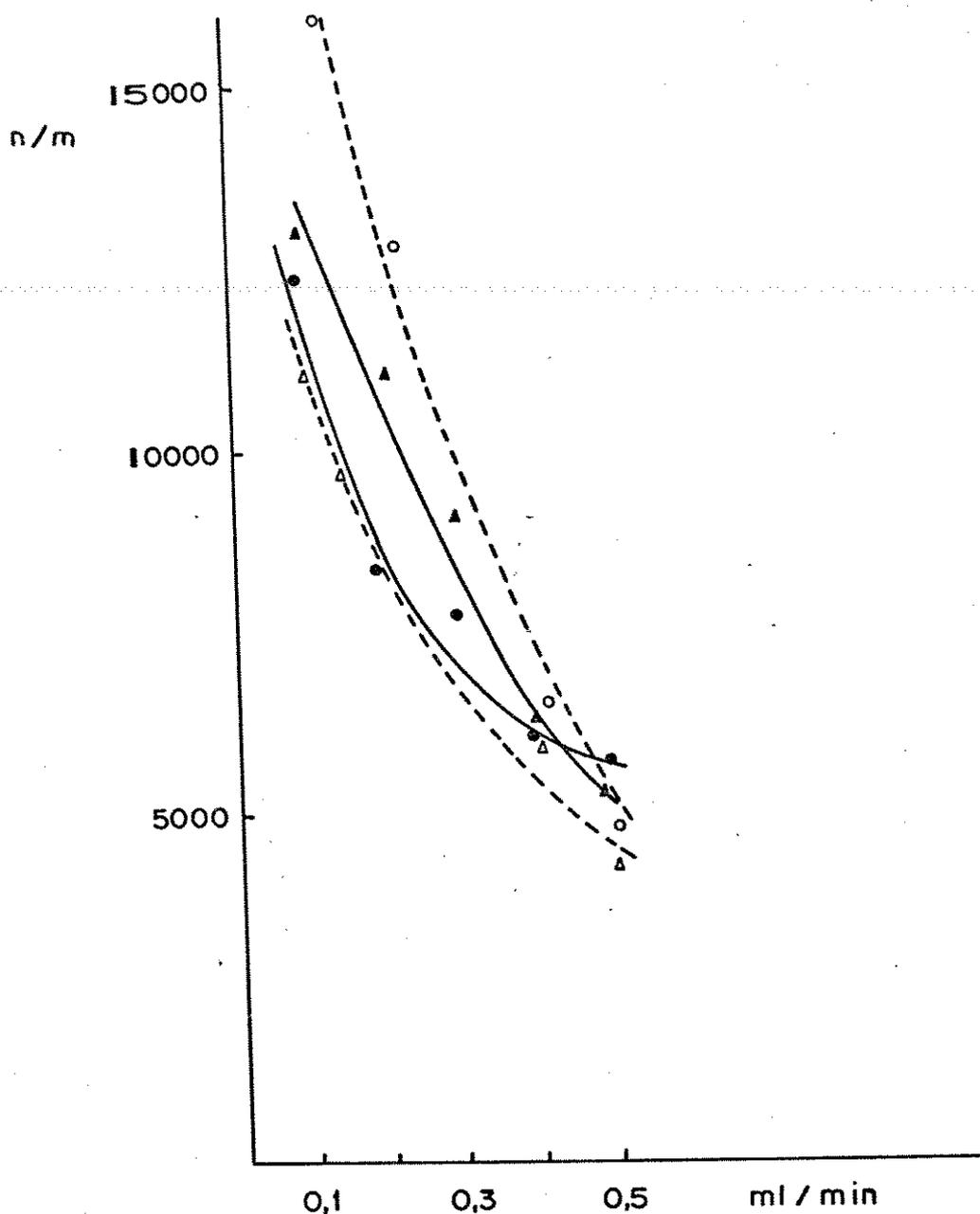


Figura 6.21 Eficiência das colunas 2a e 2b, recheadas com Partisil 10 SCX, partículas de 10  $\mu\text{m}$ .

- - coluna 2a - perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3, com conector.
- ▲ - coluna 2b - perclorato de lantânio 0.05 mol/l, pH = 3, com conector.
- - coluna 2b - perclorato de lantânio 0.05 mol/l, pH = 3, sem conector.
- △ - coluna 2b - perclorato de cálcio, 0.2 mol/l, pH = 3, com conector.

ção ( $d_R$ ) do primeiro pico dos cromatogramas (monômero), de acordo com o indicado no apêndice A. A maior eficiência foi obtida com vazão de 0.1 ml/min, no entanto, para diminuir o tempo de análise, empregou-se vazões maiores nos experimentos.

A coluna 2b apresentou uma eficiência ligeiramente superior a da coluna 2a, quando empregada com perclorato de lantânio, em vazões mais reduzidas. Isto pode ser devido ao fato de que a coluna 2a foi recheada com material já utilizado em experimentos anteriores, enquanto que, a coluna 2b foi recheada com material novo. A mudança do eluente para perclorato de cálcio diminuiu a eficiência da coluna 2b.

Para verificar a influência do volume morto na eficiência destas colunas, retirou-se o conector entre a coluna e detector, e fez-se a ligação diretamente, observando-se um aumento na eficiência, principalmente em vazões reduzidas. A eficiência máxima obtida poderia ser aumentada se houvesse disponibilidade de uma bomba capaz de fornecer vazões inferiores a 0.1 ml/min.

#### 6.4.3 Estabilidade das espécies hidrolíticas em presença de perclorato de lantânio

Para investigar a estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III) em presença de perclorato de lantânio foi feito o seguinte experimento: 5  $\mu$ l de uma amostra contendo uma mistura de espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  foi analisada empregando o método do nitrato de cálcio; a outros 10  $\mu$ l adicionou-se 200  $\mu$ l de uma solução de perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3. Esta mistura foi deixada em repouso por 20 minutos, o tempo necessário para eluição das espécies no método utilizando colunas com diâmetro

interno de 2 mm, e depois foi analisada empregando o método do nitrato de cálcio. Os resultados são mostrados na tabela 6.8.

Tabela 6.8 Estabilidade das espécies hidrolíticas de Cr(III) em presença de perclorato de lantânio.

amostra	M (%)	D (%)	T (%)	P (resina)(%)
a	15.6	20.2	11.3	52.9
b	16.4	20.7	11.7	51.2

a - amostra original.

b - amostra estocada em perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3, por 20 minutos.

Como pode-se verificar, houve apenas um possível ligeiro aumento na porcentagem de monômero, não significativo, considerando-se o erro do método.

#### 6.4.4 Estudo da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III) em função do tempo de estocagem

A coluna 2a foi utilizada para verificar como as espécies hidrolíticas de Cr(III) se comportavam em função do tempo de estocagem, de maneira similar com o que foi feito com amostras contendo  $^{51}\text{Cr}$ , empregando o método do nitrato de cálcio (6.2.2). As amostras para este experimento foram preparadas utilizando-se o método do redutor de Jones, com as seguintes condições:

- Zinco em pó amalgamado com 10% de mercúrio
- Dimensões da coluna = 0.5 x 1.5 cm
- Oxigênio borbulhado na solução efluente por 15 minutos

A Tabela 6.9 mostra outras variáveis do método, modificadas para cada amostra.

Tabela 6.9 Preparação de amostras contendo espécies hidrolíticas de Cr(III).

amostra	pH da solução de perclorato de cromo 0.1 mol/l	pH após eluição pela coluna de Zn amalgamado	vazão da solução pela col.
D 5	1.2	1.2	1 ml/min
D 6	2.3 *	2.5	1 ml/min
D 7	3.3 *	2.6	1 ml/min
D 8 **	1.2	1.2	1 ml/min
D 9	1.2	1.2	0.5 ml/min

\* pH ajustado com NaOH 3 mol/l

\*\* estocada na geladeira

Verificou-se que ocorre uma rápida conversão do dímero a monômero, em amostras onde o pH é baixo (pH = 1.2), preparadas segundo o método do redutor de Jones, logo após sua preparação (figura 6.22). Após cerca de 20 dias esta conversão passa a ser mais lenta. Observou-se também que a conversão de dímero a monô-

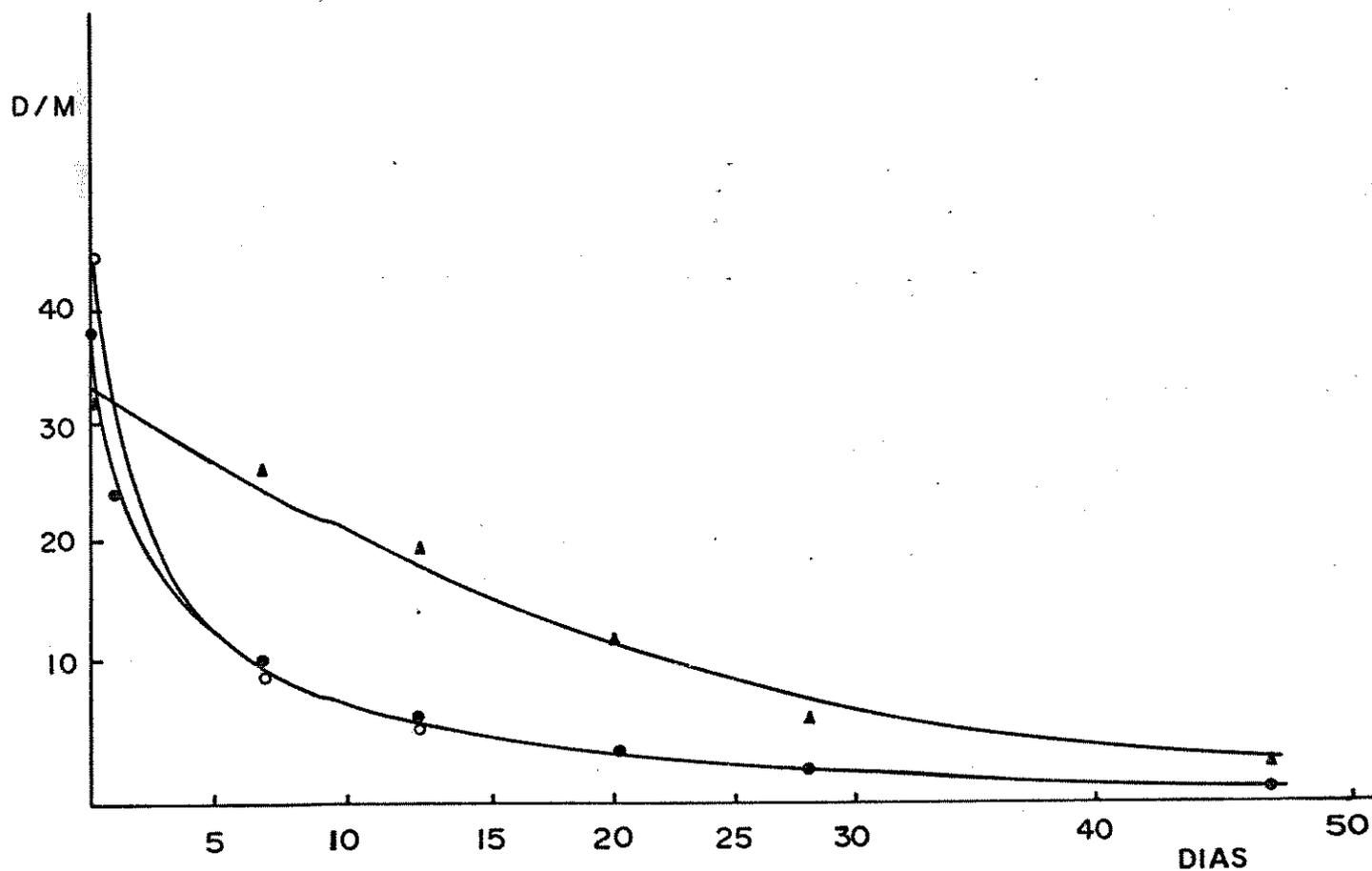


Figura 6.22 Estudo da estabilidade de amostras contendo espécies hidrolíticas de Cr(III).

D/M - Relação entre a altura do pico do dímero pela altura do pico do monômero.

- - D 5
- ▲ - D 8
- - D 9

mero é mais lenta em amostras estocadas a 4°C (D<sub>8</sub>). Outro fato observado, já relatado anteriormente, foi a obtenção de preferencialmente dímero quando partia-se de uma solução do monômero em pH  $\approx$  1. Nestas amostras não foram observados polímeros, que devem estar presentes em baixas concentrações. Por outro lado, se o pH da solução de perclorato de cromo fosse ajustado para aproximadamente 3, havia uma polimerização nesta etapa, obtendo-se uma mistura de espécies. Nestas amostras (Figura 6.23), observou-se uma lenta diminuição na relação dímero/monômero, a medida em que se aumentava o tempo de estocagem, indicando um aumento na porcentagem de monômero. A relação entre a altura do pico do tetrâmero e a altura do pico do trímero sofreu uma ligeira diminuição, indicando um aumento na porcentagem do trímero.

Os dados relatados acima podem ser explicados da seguinte maneira: o pH da solução de perclorato de cromo foi ajustado para 2.3 e 3.3 nas amostras especificadas como D<sub>6</sub> e D<sub>7</sub>, respectivamente; após eluição pela coluna de zinco amalgamado, o pH passou para 2.5 e 2.6 para as amostra D<sub>6</sub> e D<sub>7</sub>, respectivamente. Estes valores de pH mantiveram-se constantes em função do tempo de estocagem, portanto um valor baixo, onde ocorre preferencialmente a despolimerização. Quando se analisa a variação do pH das amostras, antes e depois da eluição pela coluna de zinco, deve-se levar em consideração que a coluna é condicionada com ácido perclórico 0.05 mol/l, e que portanto, variações da quantidade de ácido presente na coluna causam mudanças no pH final da amostra.

Nestes experimentos, optou-se por relacionar a razão entre altura de 2 picos com o tempo de estocagem, para evitar que erros na injeção acarretassem em erros na determinação da altura dos picos. Os pontos representam a média de três medidas. O erro

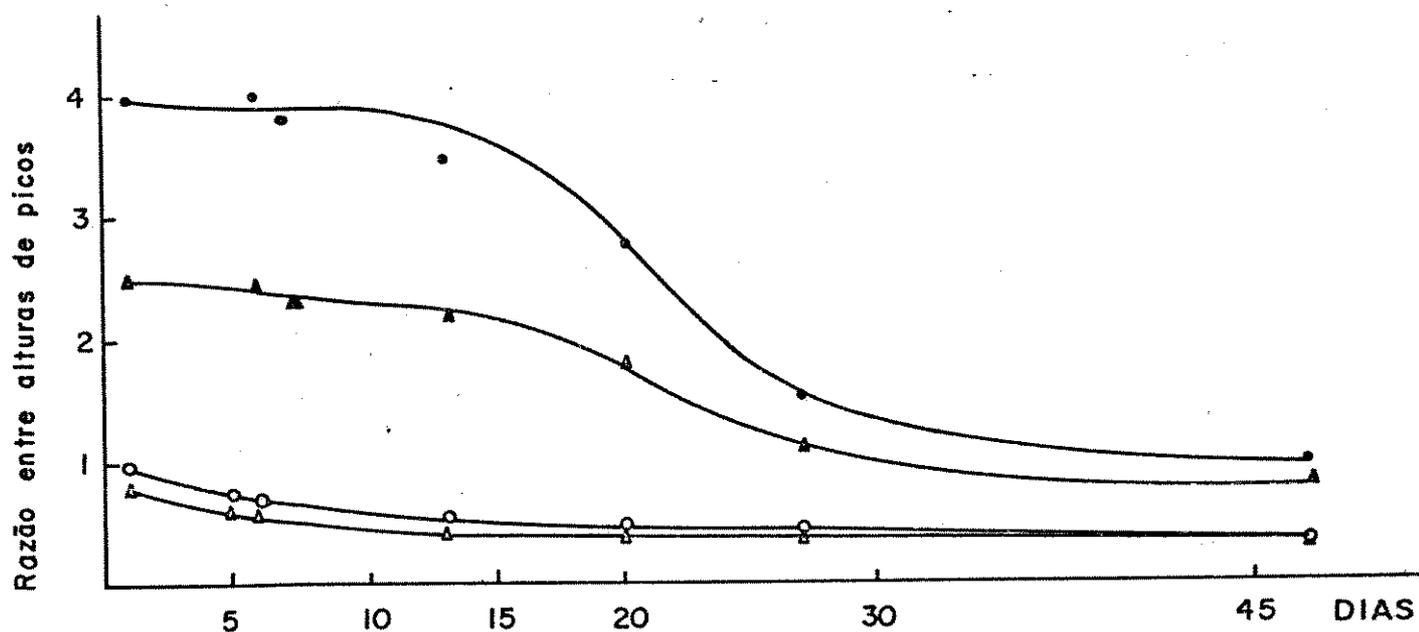


Figura 6.23 Estudo da estabilidade de espécies hidrolíticas de Cr(III).

- - D/M para a amostra D<sub>6</sub>
- - Te/T para a amostra D<sub>6</sub>
- ▲ - D/M para a amostra D<sub>7</sub>
- △ - Te/T para a amostra D<sub>7</sub>

D e M significam dímero e monômero, respectivamente  
 Te e T significam tetrâmero e trímero, respectivamente.

nas medidas correspondentes aos tempos iniciais de estocagem são maiores, com desvio padrão absoluto de 3.5 e 2.6 para os tempos  $t = 0$  e  $t = 1$ , respectivamente, devido à reduzida altura do pico do monômero. Nos demais tempos as medidas possuem um desvio menor (0.1).

De acordo com os dados da Figura 6.22 pode-se fazer um cálculo aproximado do tempo de meia vida para a espécie dimérica, analisando-se apenas a primeira porção da curva. Para estes cálculos considerou-se que na amostra  $D_5$  (tomada como exemplo), existem apenas monômero e dímero, então a porcentagem de dímero será:

tempo	% de dímero
$t = 0$	97.5
$t = 1$	95.8
$t = 6$	91.5
$t = 7$	90.7
$t = 13$	87.2

O tempo de meia vida calculado para a espécie dimérica, de acordo com a Figura 6.24, foi de 77 dias. Resultado similar foi obtido com a amostra  $D_9$ , onde encontrou-se um tempo de meia vida de 72 dias. Estes dados devem ser analisados com cuidado, porque a consideração de que na amostra existem apenas monômero e dímero não é correta, pois os polímeros devem estar presentes em pequenas concentrações. Reações de decomposição destes polímeros modificam as concentrações de monômero e dímero.

Estes dados servem apenas para indicar que o tempo de meia vida da espécie dimérica, nestas condições, é de aproximada-

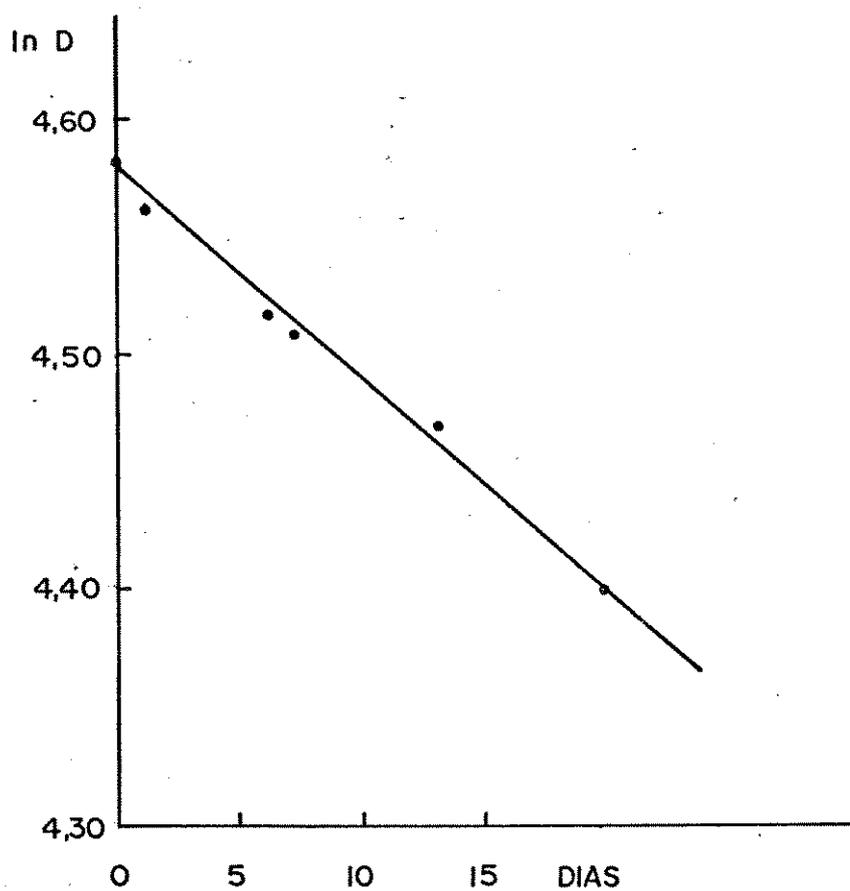


Figura 6.24 Variação da concentração relativa do dímero ( $\ln D$ ), da amostra  $D_5$ , em função do tempo de estocagem.

mente dois meses, possibilitando seu estudo, neste período de tempo.

### 6.5 Identificação das espécies

A identificação das espécies eluidas é bastante difícil, principalmente neste sistema, onde existem íons estranhos, da fase móvel, interferindo nos métodos de análise.

A literatura cita a espectrofotometria de absorção no visível como um método de identificação (2,18-22,48,53), mas como pode-se verificar na Figura 6.25, os espectros destas espécies são muito semelhantes. Se uma espécie estiver contaminada com pequenas proporções das outras, através do espectro ela pode ser julgada como sendo pura.

Tentou-se empregar a espectrofotometria por absorção no visível para identificar as espécies separadas pelo método do nitrato de cálcio, neste caso, empregando espécies não marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ . A Figura 6.26 mostra o espectro de absorção obtido neste trabalho. O solvente para o monômero foi nitrato de cálcio 0.3 mol/l, pH = 2 e para o dímero, nitrato de cálcio 0.5 mol/l, pH = 2, também usados nas celas de referências. Não foram obtidos espectros do trímero e tetrâmero devido as pequenas quantidades destas espécies presentes na amostra original. Procurou-se minimizar o tempo decorrido entre as separações e a obtenção do espectro, para evitar que possíveis reações interferissem nos resultados. O tempo máximo de estocagem foi de 30 minutos.

O resultado obtido neste trabalho foi semelhante ao citado na literatura (20), mas não foi possível obter certeza sobre a identidade das espécies.

O comportamento cromatográfico também pode fornecer in-

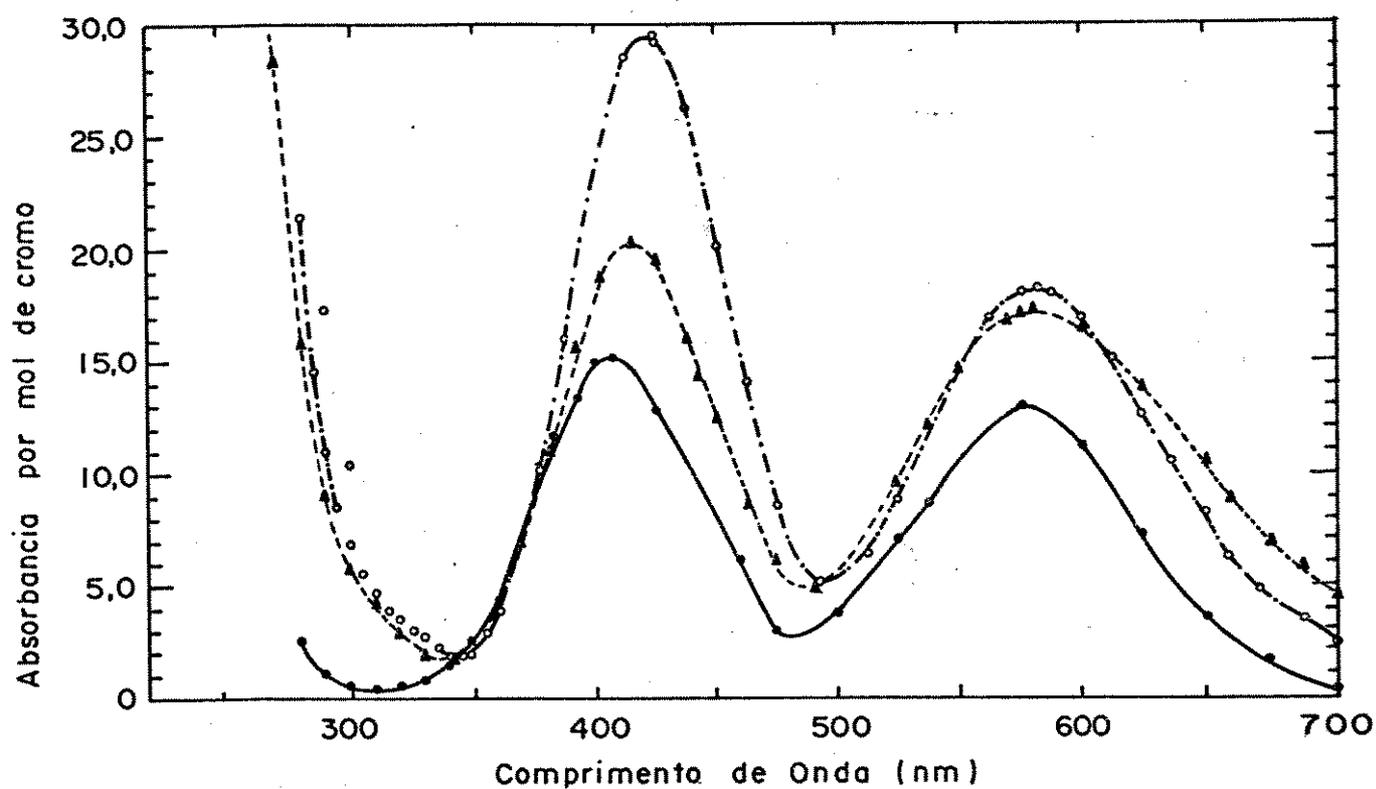


Figura 6.25 Espectro de absorção no visível das espécies hidrolíticas de Cr(III) (20).

- - monômero
- ▲ - dímero
- - trímero

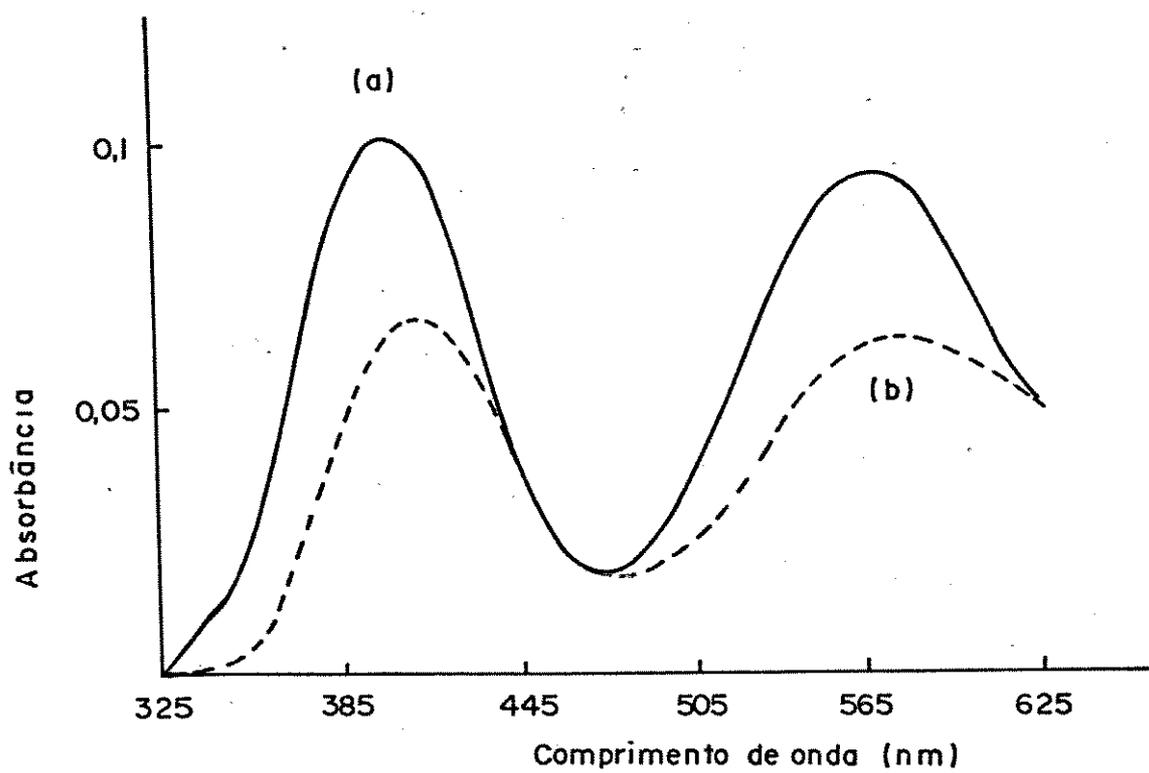


Figura 6.26 Espectro de absorção no visível do monômero (a) e dí-  
mero (b).

formações importantes. Como tem-se usado fases estacionárias de troca iônica, baseadas em sílica ou resinas, supõe-se que a ordem de eluição será em função da carga das espécies; isto é, os tempos de retenção das espécies mais polimerizadas serão maiores. Portanto, os quatro primeiros picos dos cromatogramas seriam monômero, dímero, trímero e tetrâmero; no entanto, pode estar havendo eluição de duas espécies em um único pico.

O primeiro pico obtido no método de nitrato de cálcio (eluição com nitrato de cálcio 0.3 mol/l) ou nos métodos empregando CLAE, com colunas de 4.6 ou 2 mm de diâmetro interno é provavelmente o monômero, visto que amostras originais de  $^{51}\text{Cr}$ , que possuem praticamente somente o monômero, fornecem a maior parte da atividade neste pico.

O dímero não pode estar sendo eluído junto com o monômero, em nenhum dos métodos, pois quando analisa-se uma amostra, preparada segundo o método do redutor de Jones, que fornece principalmente esta espécie, obtém-se a maior parte da atividade no segundo pico.

Resta saber se o trímero está sendo eluído junto com o segundo pico, ou se é o terceiro pico dos cromatogramas. Para tanto, foram feitos alguns experimentos.

Uma amostra contendo uma mistura de espécies hidrolíticas de  $\text{Cr(III)}$  foi analisada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, empregando a coluna de 4.6 mm de diâmetro interno e usando solução de nitrato de cálcio 0.2 mol/l,  $\text{pH} = 3$ , como fase móvel. Foram coletados os picos denominados como sendo 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 6.11) e cada um destes picos foi injetado em uma coluna recheada com resina AG 50W X-4, partículas de 38-75  $\mu\text{m}$ ; a eluição foi efetuada com nitrato de cálcio e de lantânio,  $\text{pH} = 2$  (método do nitrato de cálcio).

Analisando a Tabela 6.10, que mostra os resultados obtidos, verifica-se uma coincidência na eluição das espécies; isto é, cada pico de um método relaciona-se com outro pico no método alternativo. O quinto pico obtido no sistema CLAE elui juntamente com o quarto pico, quando utiliza-se o método do nitrato de cálcio, mostrando que o nitrato de lantânio realmente está eluindo duas espécies.

Tabela 6.10 Análise dos picos eluidos da coluna de 4.6 mm de diâmetro interno pelo método do nitrato de cálcio.

número do pico	atividade eluida com nitrato de cálcio, pH = 2 (mol/l) (%)			atividade eluida com nitrato de lantânio pH = 2 (mol/l) (%)		atividade na resina (%)
	0.3	0.5	1	0.5		
1	99.3	-	-	-	-	0.7
2	11.5	86.5	-	-	-	2.0
3	2.2	6.1	85.6	-	-	6.1
4	0.7	1.7	21.1	67.9	-	8.6
5	0.5	0.9	3.9	77.2	-	17.5

As amostras foram coletadas na saída do detector e imediatamente analisadas. A presença de atividade na resina pode ser devido aos polímeros retidos fortemente no topo da coluna, de análises anteriores, que são eluidos lentamente e contaminam cada amostra; a atividade presente nos picos anteriores ao de atividade máxima pode ser devido a uma contaminação ou devido a reações

de decomposição na presença da fase móvel. Por exemplo, no caso de contaminação, o segundo pico pode estar contaminado com a cauda do pico do monômero, que elui imediatamente antes.

A mesma série de experimentos foi feita empregando a coluna de 2 mm de diâmetro interno (coluna 2b), obtendo-se resultados similares.

Tabela 6.11 Análise dos picos eluidos de uma coluna de 2 mm de diâmetro interno pelo método do nitrato de cálcio.

número do pico	atividade eluída com nitrato de cálcio, pH = 2 (mol/l)(%)			atividade na res(%)
	0.3	0.5	1	
1	98.3	1.2	-	0.5
2	11.7	85.2	1.9	1.2
3	8.3	12.3	74.6	4.8
4	5.3	8.3	18.5	67.9

Aqui, as reações de decomposição são mais prováveis devido ao longo tempo de estocagem da amostra em perclorato de lantânio 0.03 mol/l, pH = 3 empregado na eluição dos picos da coluna de 2 mm de diâmetro interno. Este tempo de estocagem foi de 10, 60, 30 e 150 minutos para os picos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Através destes experimentos verificou-se apenas que os métodos separam os picos de maneira coincidentes, mas ainda resta saber se ocorre a eluição de duas espécies em um único pico, no caso do trímero e tetrâmero. Para verificar esta suposição, fez-se uma análise de uma amostra contendo uma mistura de espécies

marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , empregando o método do nitrato de cálcio, com uma variação: foi utilizada a mesma série de eluentes em uma coluna de  $0.6 \times 4$  cm recheada com a mesma resina. O cromatograma da Figura 6.27 mostra que o nitrato de cálcio 0.3 e 0.5 mol/l eluem apenas uma espécie, como já havia sido verificado anteriormente, enquanto que, nota-se a eluição de duas espécies com nitrato de cálcio 1 mol/l. A segunda espécie eluída com nitrato de cálcio 1 mol/l representa as espécies que eluem com nitrato de lantânio, devido ao maior número de frações coletadas com este eluente. Isto é indicado na Tabela 6.12 que compara a porcentagem de cada espécie nas duas análises da mesma amostra.

Na coluna com 2 cm de altura, o nitrato de lantânio elui 19.3% da atividade, enquanto que 33.3% fica retida na resina. Na coluna de 4 cm, a atividade eluída com o nitrato de lantânio aumenta o valor obtido com o nitrato de cálcio 1 mol/l, e o restante é considerado como atividade na resina.

Tabela 6.12 Comparação entre duas análises pelo método do nitrato de cálcio usando colunas de diferentes alturas.

altura da coluna	porcentagem da atividade eluída com nitrato de cálcio (mol/l)			atividade na resina (%)
	pH = 2	0.5	1	
2 cm	15.5	20.8	11.1	52.6 *
4 cm	16.4	18.9	27.8	36.9

\* - incluindo 19.3 % eluído com nitrato de lantânio 0.5 mol/l, pH = 2 e 33.3 % retido na resina

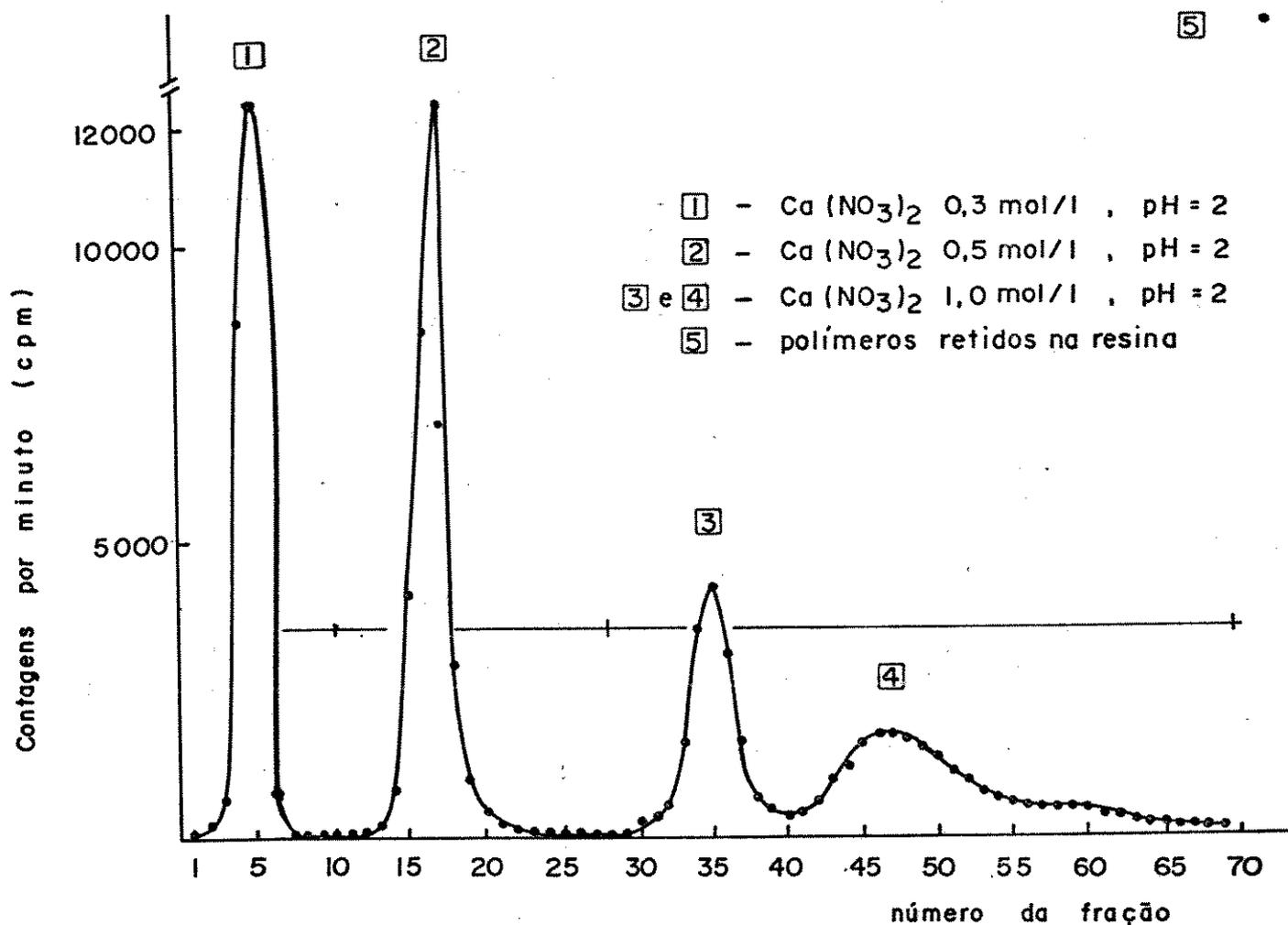


Figura 6.27 Separação de espécies hidrolíticas de Cr(III) empregando o método do nitrato de cálcio com coluna de maior altura.

Fase estacionária: AG 50W X-4, partículas de 38 - 75  $\mu\text{m}$ . Dimensões da coluna: 0,6 x 4 cm. Vazão da fase móvel: 0,5 ml/min. Volume da amostra injetada 50  $\mu\text{l}$ . Volume das frações coletadas: 2 ml. Detector de NaI(Tl).

Baseados nesta série de experimentos, conclui-se que no método do nitrato de cálcio 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. No método de cromatografia líquida de alta eficiência, empregando a coluna de 4.6 mm de diâmetro interno tem-se a eluição do monômero, dímero, trímero, tetrâmero e pentâmero como 5 picos separados, no entanto, outros polímeros ficam retidos pela fase estacionária, danificando a coluna. A coluna de 2 mm de diâmetro interno elui os três primeiros picos separadamente, mas o quarto pico pode ser o tetrâmero ou uma mistura deste com o pentâmero. Novamente, deve-se citar a presença dos polímeros não eluídos.

## CAPÍTULO 7

## CONCLUSÕES

O método do nitrato de cálcio é bastante viável e já está sendo empregado na rotina do laboratório. É um método bastante simples, de baixo custo, podendo ser empregado em qualquer laboratório. Este método pode ser utilizado em análises a nível de traços, como no caso da separação de espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , ou em maiores concentrações, já que a capacidade da fase estacionária empregada é alta. A separação de cinco picos em 2 horas de análise, é um índice razoável, para um método tão simples. Outra vantagem do método é a possibilidade de recuperação da fase estacionária, através do tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, que promove a oxidação do  $\text{Cr(III)}$ , fortemente retido, a  $\text{Cr(VI)}$  que é facilmente deslocado.

A utilização de colunas de teflon, recheadas com resina de troca catiônica não mostrou-se promissor, devido aos problemas de forte retenção das espécies mais poliméricas na fase estacionária; seria necessário uma quantidade elevada de eluente para conseguir-se a eluição das espécies retidas, o que levaria a um tempo de análise muito grande e a uma perda na sensibilidade. Colunas de teflon recheadas com estas resinas podem ser empregadas em outros tipos de análises, visto que, são de fácil construção, possuem diâmetros internos variados e são inertes às fases móveis empregadas em cromatografia líquida.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência,

nária de troca iônica também apresentou resultados positivos. É um método rápido, no entanto, requer equipamento sofisticado e implica em um maior custo operacional. A separação de 4 picos empregando a coluna de 10 x 250 mm recheada com Vydac SC cation, partículas de 30 a 44  $\mu\text{m}$ , possui as desvantagens de necessidade de utilização de eluição com gradiente e utilização de fase móvel de estocagem mais cuidadosa. A utilização de fase estacionária com menor diâmetro de partículas e maior capacidade, em colunas de menor diâmetro interno (4.6 mm) resultou na separação de cinco picos, o melhor resultado obtido neste trabalho. Neste método utilizou-se soluções de nitrato de cálcio, como fase móvel, para evitar o problema de estocagem relacionado acima.

O inconveniente de forte retenção de algumas espécies pode ser resolvido através da utilização de um pré-coluna entre o injetor e a coluna analítica. No entanto, a análise quantitativa deve ser cuidadosa, pois estas espécies são eluídas lentamente e contaminam cada pico.

A utilização de colunas com menor diâmetro interno, no caso 2 mm, requer maiores cuidados quanto a partículas presentes na fase móvel ou na amostra e na eliminação de volume morto no sistema. Também requer equipamento sofisticado, no entanto, o custo operacional é reduzido devido a utilização de menores vazões da fase móvel. Aqui, não é indicado a utilização de pré-coluna o que acarretaria em um volume morto mais elevado. Outros eluentes mais fortes ou outros tipos de fases estacionárias devem ser estudados, para tornar o método mais viável.

A fase estacionária empregada nos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência, tanto em colunas de 4.6 mm como 2 mm de diâmetro interno é composta de partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Uma diminuição no diâmetro das partículas acarretaria em um segu-

ro aumento na eficiência das colunas, o que melhoraria as separações. Não foi possível a utilização de fases estacionárias com menor diâmetro de partículas devido a não disponibilidade. Outro fator que leva a um aumento na eficiência da coluna é a técnica de enchimento, que deve ser mais aprimorada, no caso de colunas de diâmetro interno reduzido.

Estes métodos que foram desenvolvidos poderão ser utilizados para o estudo do comportamento destas espécies em solução, determinação de suas estruturas, constantes de hidrólise, etc. Servirão ainda, para o estudo da química do cromo, de um modo geral, onde estas espécies podem ser produzidas empregando condições adequadas.

## CAPÍTULO 8

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- C.F.Baes, Jr e R.E.Mesmer, "The Hidrolysis of Cations", John Wiley e Sons, New York, 1976.
- 2- S.G.Thompson, "Hydrolytic Polymerization in Cr(III) solutions", tese de doutorado, Lawrence Radiation Laboratory, UCRL-1 1410, Berkeley, CA, 1964.
- 3- T.Tandø, J.E.Pettersen e T.Torgrimsen, *Chromatographia*, 13(1980)607.
- 4- K.E.Lawrence, G.W.Rice e V.A.Fassel, *Anal.Chem.*, 56(1984)289.
- 5- R.E.Cranston e J.W.Murray, *Anal.Chim.Acta.*, 99(1978)275.
- 6- K.Fujiwara, S.Toda e K.Fuwa, *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, 54(1981)3209.
- 7- G.E.Batley e J.P.Matousek, *Anal.Chem.*, 52(1980)1570.
- 8- A.J.Pik, J.M.Eckert e K.L.Williams, *Anal.Chim.Acta*, 124(1981)351.
- 9- G.J.Jong e V.A.Th.Brinkman, *Anal.Chim.Acta*, 98(1978)243.
- 10- N.Bjerrum, "Studiere Over Basiske Kromiforbindelsen", tese, Copenhagen, Dinamarca, 1908, citação da referência 2.
- 11- E.Stiasny e D.Balanyi, *Collegium* (1927)86, citação da referência 2.
- 12- R.Schaal e J.Faucherre, *Bull.Soc.Chim.France*, 14(1947)927.
- 13- H.T.Hall e H.Eyring, *J.Am.Chem.Soc.*, 72(1950)782.
- 14- P.Souchay, *Bull.Soc.Chim.France*, 15(1948)143.
- 15- N.O.Smith, *J.Am.Chem.Soc.*, 69(1947)91.

- 16- N.Bjerrum, *Z.Physik.Chem.*, 110(1924)656, citação da referência 13.
- 17- A.Colson, *Ann.Chem.Phys.*, 12(1907)423, citação da referência 13.
- 18- H.Stunzi e W.Marty, *Inorg.Chem.*, 22(1983)2145.
- 19- J.A.Laswick e R.A.Plane, *J.Am.Chem.Soc.*, 81(1959)3564.
- 20- M.E.Thompson e R.E.Connick, *Inorg.Chem.*, 20(1981)2279.
- 21- J.E.Finholt, "Chemistry of some Hydrolyzed Cr(III) Polymers", tese de doutorado, Laurence Radiation Laboratory, UCRL-8879, Berkeley, CA., 1960.
- 22- J.E.Finholt, M.E.Thompson e R.E.Connick, *Inorg.Chem.*, 20(1981)4151.
- 23- H.Stunzi, F.P.Rotzinger e W.Marty, *Inorg.Chem.*, 23(1984)2160.
- 24- M.Ardon e R.A.Plane, *J.Am.Chem.Soc.*, 81(1959)3197.
- 25- M.Ardon e A.Linenberg, *J.Phys.Chem.*, 65(1961)1443.
- 26- R.W.Kolaczowski e R.A.Plane, *Inorg.Chem.*, 3(1964)322.
- 27- M.Ardon e G.Stein, *J.Chem.Soc.*(1956)2059.
- 28- W.M.Thorton Jr. e J.F.Sadusk Jr., *Ind.Eng.Chem.Anal.Ed.*, 4(1932)240.
- 29- T.F.Bueher e O.E.Schupp, *Ind.Eng.Chem.*, 18(1926)121.
- 30- H.W.Stone e C.Beason, *Ind.Eng.Chem.*, 8(1936)188.
- 31- J.J.Lingane e R.L.Pecsock, *Anal.Chem.*, 20(1948)425.
- 32- H.Taube e H.Myers, *J.Am.Chem.Soc.*, 76(1954)2103.
- 33- R.L.Williams e C.W.Sill, *Anal.Chem.*, 46(1974)791.
- 34- B.A.Zabin e H.Taube, *Inorg.Chem.*, 3(1964)963.
- 35- L.S.Hegedus e A.Halm, *Inorg.Chem.*, 6(1967)664.
- 36- T.B.Joyner e W.K.Wilmarth, *J.Am.Chem.Soc.*, 83(1961)516.
- 37- P.Gutlich e G.Harbottle, *Radiochim.Acta*, 5(1966)70.

- 38- C.H.Collins, K.E.Collins e R.E.Ackerhalt, J.Radioanal. Chem., 8(1971)263.
- 39- R.E.Ackerhalt, C.H.Collins e K.E.Collins, Trans.Faraday. Soc., 65(1969)1927.
- 40- R.E.Ackerhalt, C.H.Collins e K.E.Collins, Trans.Faraday. Soc., 67(1971)1459.
- 41- R.E.Ackerhalt, C.H.Collins e K.E.Collins, Radiochim.Acta., 14(1970)49.
- 42- A.C.Adams, J.R.Crook, F.Bockhoff e E.L.King, J.Am.Chem. Soc., 90(1968)5761.
- 43- M.Ardon e B.Bleicher, J.Am.Chem.Soc., 88(1966)858.
- 44- J.C.Andrade, "Efeitos Térmicos e Radiolíticos em Cristais de  $K_2CrO_4$  dopados com  $^{51}Cr$ ", Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, SP., 1980.
- 45- J.P.Hunt e H.Taube, J.Chem.Phys., 19(1951)602.
- 46- I.Dellien, F.M.Hall e L.G.Hepler, Chemical Reviews., 76(1976)283.
- 47- L.C.W.Baker, G.Foster, W.Tan, F.Scholnick e T.P.McCutcheon, J.Am.Chem.Soc., 77(1955)2136.
- 48- Yu I.Sannikov, E.I.Krylov e V.M.Vinogradov, Russian J.Inorg.Chem., 12(1967)1398.
- 49- H.H.Cady e R.E.Connick, J.Am.Chem.Soc., 79(1957)4242.
- 50- H.H.Cady e R.E.Connick, J.Am.Chem.Soc., 80(1958)2646.
- 51- C.Furlani, G.Morpurgo e G.Sartori, Z.Anorg.Allg.Chem., 303(1960)1, citação da referência 21.
- 52- F.Woldbye, Acta Chem.Scand., 12(1958)1079.
- 53- C.K.Jorgensen, Acta Chem.Scand., 8(1954)1495.
- 54- R.S.Drago, "Physical Methods in Inorganic Chemistry, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1965.

- 55- H.Engelhardt, "High Performance Liquid Chromatography - Chemical Laboratory Practice", Springer-Verlag, Berlin, 2<sup>o</sup> ed., 1979.
- 56- R.J.Hamilton e P.A.Sewell, "Introduction to High Performance Liquid Chromatography", A Halsted Press Book-John Wiley & Sons, New York, 1978.
- 57- L.R.Snyder e J.J.Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley & Sons, Inc., New York, 2<sup>o</sup> ed., 1979.
- 58- E.L.Johnson e R.Stevenson, "Basic Liquid Chromatography", Varian Associates, Inc., Palo Alto, 1978.
- 59- J.X.Khyn, "Analytical Ion Exchange Procedures in Chemistry and Biology - Theory, Equipment, Techniques", Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1974.
- 60- O.L.Hollis, J. Chromatogr. Sci., 11(1973)335.
- 61- "Materials, Equipment and Systems for Chromatography, Electrophoresis, Immunochemistry and HPLC", catálogo E, Bio-Rad Laboratories, 1979.
- 62- J.Naveh e Y.Marcus, J. Chromatogr., 148(1978)495.
- 63- G.Schwachula e D.Lukas, J. Chromatogr., 102(1974)123.
- 64- J.Chmielewicz e W.Kemula, J. Chromatogr., 102(1974)197.
- 65- J.M.Miller, "Separation Methods in Chemical Analysis", Wiley - Interscience, New York, 1975.
- 66- E.A.Peterson e H.A.Sober, J. Am. Chem. Soc., 78(1956)751.
- 67- J.S.Fritz, D.T.Gjerde e C.Pohlandt, "Ion Chromatography", Dr Alfred Huthing Verlag, Gmbh, Heidelberg, 1982.
- 68- H.M.McNair e B.H.Esquivel, "Cromatografía Líquida de alta Presión", Eva V.Chesneau, Washington, 1973.
- 69- S.Katz, J. Chromatogr., 53(1970)415.
- 70- H.Veering, CRC Critical Reviews in Anal. Chem., 5(1975)165.

- 71- A.Y.Ku e D.H.Freeman, *Anal. Chem.*, 49(1977)11.
- 72- H.V.Drushel, *J.Chromatogr.Sci.*, 21(1983)375.
- 73- C.G.Horvath, B.A.Preiss e S.R.Lipsky, *Anal.Chem.*, 39(1967)1422.
- 74- R.Wood, L.Gummings e T.Jupille, *J.Chromatogr.Sci.*, 18(1980)551.
- 75- R.E.Majors, *J.Chromatogr.Sci.*, 15(1977)334.
- 76- R.E.Majors, *J.Chromatogr.Sci.*, 18(1980)488.
- 77- O-E Brust, I.Sebastian e I.Halász, *J.Chromatogr.*, 83(1973)15.
- 78- N.Weigand, I.Sebastian e I.Halász, *J.Chromatogr.*, 102(1974)325
- 79- A.K.Roy, A.Burgum e S.Roy, *J.Chromatogr.Sci.*, 22(1984)84.
- 80- S.D.Fazio, J.B.Crowther e R.A.Hartwick, *Chromatographia*, 18(1984)216.
- 81- B.B.Wheals, *J.Chromatogr.*, 177(1979)263.
- 82- D.C.Locke, J.T.Schmermund e B.Banner, *Anal.Chem.*, 44(1972)90.
- 83- D.H.Saunders, R.A.Barford, P.Magidman, L.T.Osizewski e H.L.Rothbart, *Anal.Chem.*, 46(1974)834.
- 84- P.A.Asmus. C-E.Low e M.Novotny, *J.Chromatogr.*, 123(1976)109.
- 85- G.B.Cox, C.R.Loscombe, M.J.Slucutt, K.Sugden e J.A.Upfield, *J.Chromatogr.*, 117(1976)269.
- 86- H.F.Walton, *Anal.Chem.*, 46(1974)399R.
- 87- H.F.Walton, *Anal.Chem.*, 48(1976)52R.
- 88- Sj.Van Der Wal e J.F.K.Huber, *J.Chromatogr.*, 102(1974)353.
- 89- Sj.Van Der Wal e J.F.K.Huber, *J.Chromatogr.*, 135(1977)287.
- 90- R.W.Stergley e N.D.Danielson, *J.Chromatogr.Sci.*, 21(1983)365.

- 91- M.Caude e R.Rosset, *J.Chromatogr.Sci.*, 15(1977)405.
- 92- M.R.Ladisch, A.L.Huebner e G.T.Tsao, *J.Chromatogr.*, 147(1978)185.
- 93- C.F.Simpson, "Practical High Performance Liquid Chromatography", Heyden e Son Limited / Continuing Education Committee of Chemical Society, Londres, 2<sup>e</sup> ed., 1978.
- 94- R.E.Majors, *Anal.Chem.*, 44(1972)1722.
- 95- T.J.N.Webber e E.H.Mckerrell, *J.Chromatogr.*, 122(1976)243.
- 96- H.A.Claessens, G.Aben e N.Vonk, *J.H.R.C. & C.C.*, 5(1982)250.
- 97- P.A.Bristow, P.N.Brittain, C.M.Riley e B.F.Williamson, *J.Chromatogr.*, 131(1977)57.
- 98- C.J.Little, A.D.Dale, D.A.Ord e T.R.Marten, *Anal.Chem.*, 49(1977)1311.
- 99- Y.Yamauchi e J.Kumanotani, *J.Chromatogr.*, 210(1981)512.
- 100- M.Verzele, *J.Chromatogr.*, 295(1984)81.
- 101- K.Kuwata, M.Uebori e Y.Yamazak, *J.Chromatogr.*, 211(1981)378.
- 102- J.J.Kirkland, *J.Chromatogr.Sci.*, 10(1972)593.
- 103- J.C.Liao e J.L.Ponzo, *J.Chromatogr.Sci.*, 20(1982)14.
- 104- M.Broquaire, *J.Chromatogr.*, 170(1979)43.
- 105- F.J.Yang, *J.H.R.C. & C.C.*, 6(1983)348.
- 106- F.J.Yang, *J.H.R.C. & C.C.*, 3(1980)589
- 107- D.Ishii e T.Takeuchi, *J.Chromatogr.*, 218(1981)189.
- 108- G.Nota, G.Marino, V.Buonocore e A.Ballio, *J.Chromatogr.*, 46(1970)103.
- 109- Y.Hirata, M.Novotny, T.Tsuda e D.Ishii, *Anal.Chem.*, 51(1979)1807.
- 110- D.Ishii, K.Asai, K.Hibi, T.Yonokuchi e M.Nagaya, *J.Chromatogr.*, 144(1977)157.
- 111- T.Takeuchi e D.Ishii, *J.Chromatogr.*, 213(1981)25.

- 112- T.Takeuchi e D.Ishii, *J.H.R.C.&C.C.*, 6(1983)682.
- 113- D.Ishii, *Actual Chim.*, 2(1977)17.
- 114- A.Basey e R.W.A.Oliver, *J.Chromatogr.*, 251(1982)265.
- 115- R.P.W.Scott, *J.Chromatogr.Sci.*, 18(1980)49.
- 116- M.Novotny, *Anal.Chem.*, 53(1981)1294A.
- 117- C.E.Reese e R.P.W.Scott, *J.Chromatogr.Sci.*, 18(1980)479.
- 118- J.Bowermaster e H.McNair, *J.Chromatogr.*, 279(1983)431.
- 119- R.P.W.Scott e P.Kucera, *J.Chromatogr.*, 169(1979)51.
- 120- C.Dewaele e M.Verzele, *J.H.R.C.&C.C.*, 3(1980)273.
- 121- P.Kucera e G.Manius, *J.Chromatogr.*, 216(1981)9.
- 122- M.Verzele e C.Dewaele, *J.H.R.C.&C.C.*, 5(1982)245.
- 123- T.Tsuda e M.Novotny, *Anal.Chem.*, 50(1978)271.
- 124- Z.Yukui, Z.Guilmin, B.Miansheng, L.Xiuzhen e L.Peichang, *Chromatographia*, 14(1981)135.
- 125- N.K.Vadukul e C.R.Loscombe, *J.H.R.C.&C.C.*, 6(1983)488.
- 126- L.Xiuzhen, Z.Guilmin, B.Miansheng, Z.Yukui e L.Peichang, *J.H.R.C.&C.C.*, 4(1981)569.
- 127- P.Kucera, *J.Chromatogr.*, 198(1980)93.
- 128- R.P.W.Scott, P.Kucera e M.Munroe, *J.Chromatogr.*, 186(1979)475.
- 129- J.L.Dicesare, M.W.Dong e J.G.Atwood, *J.Chromatogr.*, 217(1981)369.
- 130- T.Takeuchi, Y.Watanabe e D.Ishii, *J.H.R.C.&C.C.*, 4(1981)300.
- 131- C.Hongwei, B.Miansheng, F.Shuhua e L.Peichang, *Chromatographia*, 14(1981)129.
- 132- W.Th.Kok, V.A.Th.Brinkman, R.W.Frei e H.B.Hanekamp, *J.Chromatogr.*, 237(1982)357.
- 133- P.Krien, C.Devant e M.Hardy, *J.Chromatogr.*, 251(1982)129.
- 134- F.J.Yang, *J.Chromatogr.*, 236(1982)265.

- 135- H.E.Schwartz, B.L.Karger e P.Kucera, Anal.Chem.,  
55(1983)1752.
- 136- H.Menet, P.Garel, M.Caude e R.Rosset, Chromatographia,  
18(1984)73.
- 137- C.H.Collins, F.R.Aquino Neto, J.R.P.Silva, material não pu-  
blicado (1986).
- 138- A.F.Clifford, "Inorganic Chemistry of Qualitative Analy-  
sis", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1961.
- 139- A.I.Vogel, "Química Analítica Qualitativa" Editora Mestre  
Jou, São Paulo, 5ª ed., 1981.
- 140- J.R.Conder, J.H.R.C. & C.C., 5(1982)341 e 397.
- 141- M.G.Farris, material não publicado, 1983.
- 142- B.A.Bidlingmeyer e F.V.Warren Jr., Anal.Chem., 56(1984)1583  
A.
- 143- J.P.Foley e J.G.Dorsey, Anal.Chem., 55(1983)730.
- 144- W.E.Barber e P.W.Carr, Anal.Chem., 53(1981)1939.
- 145- P.A.Bristow e J.H.Knox, Chromatographia, 10(1977)279.
- 146- C.H.Wang, D.L.Willis e W.D.Loveland, "Radiotracer Methodo-  
logy in the Biological, Environmental and Physical Scien-  
ces", Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1975.

nota - S.G.Thompson (ref.2) é o mesmo autor que M.E.  
Thompson (ref.20 e 22).

## APÊNDICE A

Definição de alguns termos empregados em cromatografia  
de acordo com a referência 137

- $t_R$  - tempo de retenção do soluto
- $t_M$  - tempo de retenção de um soluto não retido pela fase estacionária
- $w_b$  - largura do pico na linha de base (entre as tangentes)
- $w_h$  - largura do pico na meia-altura
- $t'_R$  - tempo de retenção ajustado ( $t_R - t_M$ )
- $\alpha$  - fator de seletividade

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

- $k'$  - fator de capacidade

$$k' = \frac{t'_R}{t_M}$$

- $R_s$  - resolução

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$$

- $n$  - número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos é uma medida da eficiência de uma coluna e pode ser definido como:

$$n = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

onde  $\sigma^2$  é a variância para o pico, medida em unidades de tempo. A largura do pico ( $w$ ) pode ser relacionada com a variância:

$$w = a \sigma^2 \quad \text{então,}$$

$$n = a \frac{t_R^2}{w^2}$$

A largura do pico pode ser medida em várias regiões do pico, havendo conseqüentemente uma mudança nos valores de "a".

A Tabela A.1 mostra os valores de "a" e o local onde é feita a medida da largura do pico, em alguns métodos citados na literatura, para o cálculo do número de pratos teóricos (142).

Tabela A.1 Parâmetros usados para o cálculo de "n" de acordo com vários métodos.

método	valor de "a"	altura do pico onde é feita a medida da largura (%)
inflexão	4	60.7
meia-altura	5.54	50
3 $\sigma$	9	32.4
4 $\sigma$	16	13.4
5 $\sigma$	25	4.4
tangente	16	na linha de base, entre as duas tangentes

Quanto mais próxima da linha de base for a medida da largura do pico mais sujeita à influência de assimetria será a medida. Os métodos da inflexão, da meia-altura e da tangente são menos influenciados pela assimetria dos picos, portanto, os valores de "n" obtidos por estes métodos são maiores.

Além destes métodos manuais para o cálculo de "n" existem outros, que também consideram a assimetria do pico, que no entanto, requerem de sistemas de aquisição de dados e microcomputadores para os cálculos (143,144).

Neste trabalho foi empregado o método da meia altura, porque este é o método mais empregado por fabricantes de colunas (142). Assim, "n" foi calculado empregando a fórmula:

$$n = 5.545 \left( \frac{d_R}{w_h} \right)^2$$

Onde  $d_R$  é a distância de retenção do soluto, e  $w_h$  é a largura do pico na meia-altura, medidos em unidades de comprimento.

A eficiência é função do comprimento da coluna. Para comparação da eficiência entre colunas de diferentes comprimentos, emprega-se a altura equivalente a um prato teórico (h).

$$h = \frac{L}{n}$$

onde L é o comprimento da coluna.

Bristow e Knox (145) sugerem a utilização de parâmetros

reduzidos para poder comparar colunas de diferentes tamanhos, diferentes materiais de recheio, solventes de diferentes viscosidades e solutos com diferentes coeficientes de distribuição:

a- Altura reduzida equivalente a um prato teórico ( $h_r$ )

$$h_r = \frac{h}{d_p}$$

onde  $d_p$  é o diâmetro médio das partículas. Valores ótimos de  $h_r$  estão na faixa de 2 a 10 (145).

b- Velocidade reduzida da fase móvel ( $\gamma$ )

$$\gamma = \frac{\bar{u} d_p}{D_M}$$

onde  $\bar{u}$  é a velocidade linear média da fase móvel ( $\bar{u} = L/t_M$ ) e  $D_M$  é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel. Valores ideais de  $\gamma$  estão na faixa de 3 a 20.

c- Parâmetro de resistência ao fluxo

$$\Theta = \frac{\Delta_p t_M}{l^2 \eta}$$

onde  $\Delta_p$  é a queda de pressão na coluna,  $l$  é o comprimento reduzido da coluna ( $l = L/d_p$ ) e  $\eta$  é a viscosidade da fase móvel. Para técnicas de enchimento de colunas baseadas em suspensões, os valores de  $\Theta$  são por volta de 500.

A eficiência de uma coluna é função, além do comprimento, de uma série de outros fatores que podem ser descritos através da equação de Van Deemter:

$$h = A + B/\bar{u} + C\bar{u} + D\bar{u}$$

O termo A está relacionado com a difusão turbilhonar; as moléculas do soluto se movimentam pela coluna por diferentes caminhos, causando aumento na largura do pico. Este termo pode ser minimizado usando-se partículas uniformes e com pequeno diâmetro, e colunas bem recheadas.

O termo B relaciona o alargamento da banda com a difusão das moléculas do soluto, em todas as direções, na fase móvel. Pode ser minimizado utilizando-se colunas recheadas com partículas regulares e de pequeno diâmetro, e empregando altas velocidades lineares da fase móvel.

O termo C relaciona o alargamento de bandas com a transferência de massa do soluto para a fase estacionária. Uma coluna bem recheada, com pequena espessura no filme líquido da fase estacionária sobre o suporte, baixa velocidade linear da fase móvel e maior coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária, são fatores que tornam o termo C menor.

A transferência de massa do soluto para a fase móvel (termo D) está relacionada com o tamanho e forma das colunas, diâmetro das partículas, velocidade linear da fase móvel e com o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel.

## APÊNDICE B

### Características das fases estacionárias

fase estacionária	tipo	força	diâmetro das partículas ( $\mu\text{m}$ )	capacidade de troca (meq/g)	capacidade de troca (meq/ml)
AG 50W X-8	PE/DVB	ácido forte	106-250	5.1	1.7
AG 50W X-4	PE/DVB	ácido forte	38-75	5.2	1.2
AG 50W X-8	PE/DVB	ácido forte	38-63	5.1	1.7
AG 50W X-12	PE/DVB	ácido forte	38-63	5.0	2.3
Vydac SC cation	PE/DVB	ácido forte	30-44	0.1	-
Partisil 10SCX	silica	ácido forte	10	1	-

PE/DVB - Poliestireno divinilbenzeno.

## APÊNDICE C

Utilização do detector de iodeto de sódio para a detecção dos fótons gama emitidos pelo  $^{51}\text{Cr}$ 

Nos experimentos empregando cromatografia por troca iônica clássica, empregou-se espécies marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ . Nestes experimentos efetuava-se a eluição com solventes adequados e coletava-se frações de volume definido. No final da análise, a resina também era coletada em um tubo de contagem. As frações e o tubo contendo a resina eram levados ao detector de iodeto de sódio, para determinação da atividade presente em cada tubo, na forma de contagens por minuto (cpm). Os valores de contagens por minuto eram corrigidos subtraindo-se o valor de  $\overline{\text{Bg}}$  (back ground médio), somava-se estes valores corrigidos relativos a cada pico no cromatograma, e comparava-se a atividade em cada pico com a atividade total (somatória da atividade em cada tubo, inclusive o que contém a resina), obtendo-se a porcentagem de atividade em cada pico.

O detector de iodeto de sódio funciona da seguinte maneira (146): uma amostra contendo um radioisótopo, no caso  $^{51}\text{Cr}$ , é colocada no poço do detector (cristal de iodeto de sódio, dopado com tálio). Os raios gama emitidos pela amostra atingem o cristal, produzindo fótons, com energia na região do visível, proporcional à energia da radiação gama inicial. Estes fótons atingem uma fotomultiplicadora, produzem elétrons que são acelerados e multiplicados. Estes elétrons geram pulsos de voltagem que são ampliados por um pré-amplificador e um amplificador linear. Um analisador de pulso seleciona uma faixa estreita de pul-

soz relacionados com a energia do raio gama emitido originalmente. Os pulsos aceitos pelo analisador são contados.

A Figura C.1 mostra o esquema de decaimento para o  $^{51}\text{Cr}$ . Apenas os 10% do  $^{51}\text{Cr}$  que atingem o estado fundamental do  $^{51}\text{V}$ , através de um estado excitado intermediário é que são utilizados na detecção do  $^{51}\text{Cr}$ .

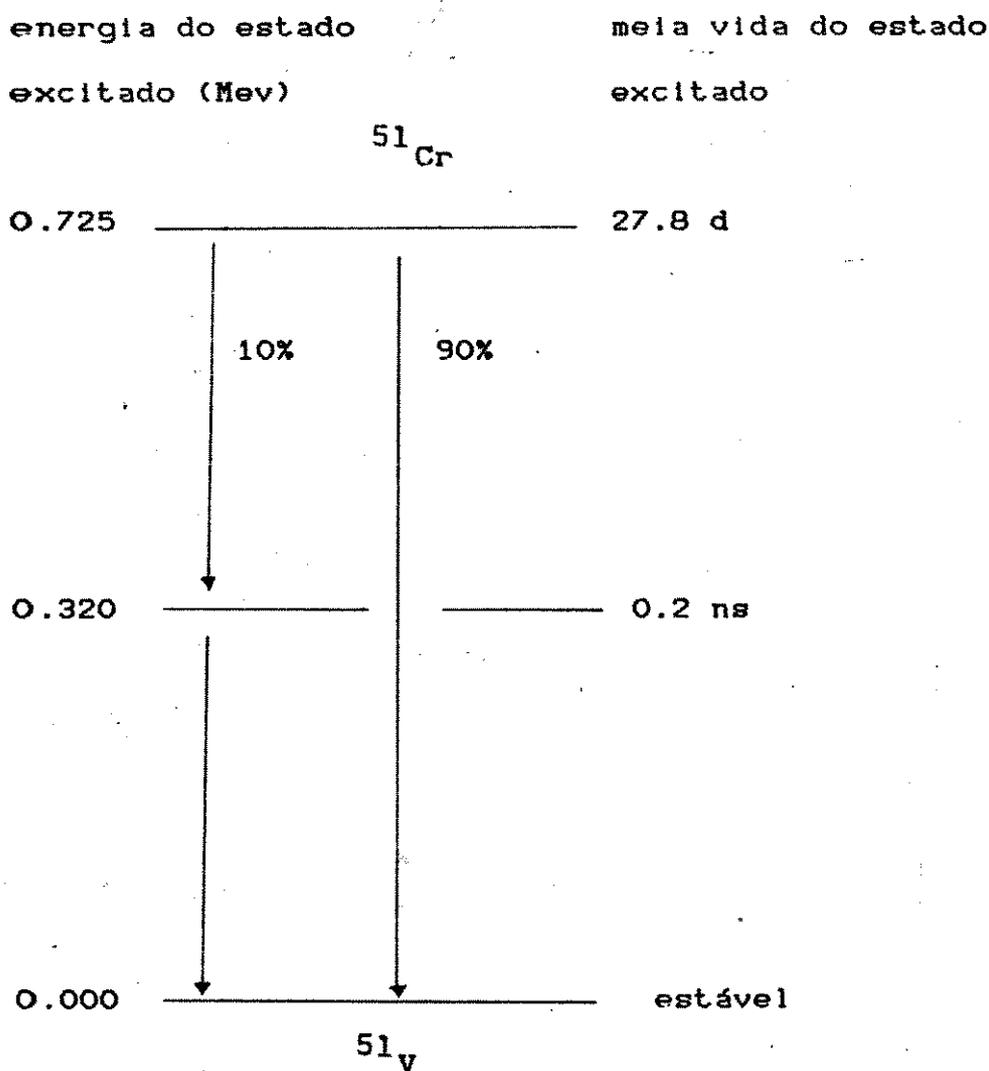


Figura C.1 Esquema do decaimento do  $^{51}\text{Cr}$  para  $^{51}\text{V}$ .