

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO DE ACETATO, NITRATO, FERRO(II),
FERRO(III) E COBRE EM ETANOL COMBUSTÍVEL POR
CROMATOLOGRAFIA DE ÍONS**

Jailson Cardoso Dias

Autor

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Orientador

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

D543d Dias, Jailson Cardoso.
 Determinação de acetato, nitrato, ferro(II), ferro(III) e cobre
 em etanol combustível por cromatografia de íons / Jailson
 Cardoso Dias. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Cromatografia. 2. Troca iônica. 3. Quelação. 4. Etanol
combustível. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Determination of acetate, nitrate, iron(II), iron(III) and copper in fuel ethanol by using ion chromatography

Palavras-chaves em inglês: Chromatography, Ion exchange, Chelation, Fuel ethanol

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Nelson Ramos Stradiotto (IQ-UNESP-Araraquara), Ricardo Erthal Santelli (DG-UFF-RJ), Paulo de Tarso Vieira e Rosa (IQ-UNICAMP), Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 22/03/2010

*À minha família que, mesmo distante
fisicamente, sempre esteve presente
de alguma forma.*

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas e instituições contribuíram de diferentes formas para a evolução deste trabalho, sem as quais não seria possível a sua conclusão.

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas, por todos os livramentos e por tudo aquilo que ainda está por vir.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa longa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lauro T. Kubota, pela oportunidade e confiança no desafio de desenvolver este trabalho, pela orientação competente e pelos importantes esclarecimentos ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Pavel N. Nesterenko por sua inigualável contribuição neste trabalho, por sua preocupação e constante disposição em ajudar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Paul R. Haddad pela oportunidade de fazer parte de um dos grupos de pesquisa mais conceituados do mundo na área de ciência da separação.

Aos membros da banca do exame de qualificação geral, Profa. Dra. Isabel Cristina S. F. Jardim, Profa. Dra. Carla Beatriz G. Bottoli e Prof. Dr. Edvaldo Sabadini, pelo tema escolhido e pela avaliação do trabalho, que tanto contribuíram para o meu aprendizado.

Aos membros da banca do exame de qualificação de área e da tese, Profa. Dra. Carol H. Collins, Profa. Dra. Isabel Cristina S. F. Jardim, Prof. Dr. Paulo de Tarso V. e Rosa, Profa. Dra. Maria Izabel M. S. Bueno, Prof. Dr. Nelson R. Stradiotto, Prof. Dr. Ricardo E. Santelli e Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela disposição em participar da avaliação deste trabalho, contribuindo enormemente com suas valiosas críticas, sugestões e revisão do texto.

Ao Serviço de Apoio ao Estudante da UNICAMP pelo apoio financeiro e auxílio moradia durante os primeiros meses de curso.

A todos os amigos que já passaram pelo LEEDS e aos que ainda se encontram, pela companhia, apoio, amizade e pelos momentos de descontração e lazer.

A todos os membros do Centro Australiano de Pesquisa em Ciência da Separação (ACROSS) e da Escola de Química da Universidade da Tasmânia pelo suporte, apoio e amizade.

Ao assessor científico da FAPESP, responsável pela avaliação anual do projeto de pesquisa, pelas valiosas críticas e sugestões que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Marcio Vidotti pela amizade e pelo grande incentivo à participação em eventos e estágios no exterior.

Ao Prof. Dr. Waterloo N. de Lima (*in memoriam*), meu orientador de iniciação científica, um grande mestre e incentivador, por sua alegria, simplicidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Sambasiva R. Patchineelam, meu orientador de mestrado, por seu exemplo de vida, seus ensinamentos, conselhos e amizade.

À bolsista de iniciação científica Erica Mano pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

À Samanta Chiquetti pelo carinho, amizade e pelos bons momentos de descontração.

Ao Alexandre Kisner pela amizade e pelos relevantes esclarecimentos ao longo do curso.

Ao Phabyanno Lima e à Wilney Santos pelos bons momentos de amizade e descontração que tivemos.

À minha conterrânea e amiga Danielle Quemel pelo companheirismo e pelos bons momentos de descontração.

Aos meus conterrâneos e amigos Aldecir Araújo e Adalberto Lima pela grande ajuda de hospedagem no início do curso, pelo apoio e pela oportunidade que o Aldecir me proporcionou de trabalhar como professor na Faculdade de Americana.

Ao Alexandre Felizola e Phabyanno Lima, à Cecília Silva, Danielle Ferreira, Edvânia Pontes, Luciana Martins, Michella Lima, Wilney Santos e à equipe de médicos e enfermeiros do Hospital das Clínicas da UNICAMP por toda a ajuda durante o período crítico pelo qual passei por problemas de saúde.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudo.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o progresso de minha vida acadêmica de maneira geral, que começou ainda no curso de graduação, deixo aqui registrado o meu *MUITO OBRIGADO*.

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

SÚMULA CURRICULAR

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: Jailson Cardoso Dias

Filiação: Antônio da Silva Dias e Maria Cardoso Dias

Data de Nascimento: 19/05/1982 (Belém, PA)

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2006-2010 Doutorado em Ciências (Química Analítica)

Título da Tese: Determinação de acetato, nitrato, ferro(II), ferro(III) e cobre em etanol combustível por cromatografia de íons

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas (SP), com período sanduíche na Universidade da Tasmânia, UTAS, Hobart (Austrália), sob orientação dos professores Dr. Pavel Nikolaevich Nesterenko e Dr. Paul Raymond Haddad

2004-2006 Mestrado em Geociências (Geoquímica Ambiental)

Título da Dissertação: Diagênese e acumulação de fósforo em sedimentos de áreas distintas na Baía de Sepetiba

Orientador: Prof. Dr. Sambasiva Rao Patchineelam

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói (RJ)

2000-2004 Bacharelado em Química

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Comparação de métodos para a determinação de matéria orgânica em amostras ambientais

Orientador: Prof. Dr. Waterloo Napoleão de Lima

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq

Universidade Federal do Pará, UFPA, Belém (PA)

2000-2002 Curso Técnico em Química

Centro Federal de Educação Tecnológica do Pará, CEFET-PA, Belém (PA)

PRODUÇÃO CIENTÍFICA SELECIONADA

Artigos Publicados

1. Vidotti, M.; Cerri, C. D.; Carvalhal, R. F.; Dias, J. C.; Mendes, R. K.; de Torresi, S. I. C.; Kubota, L. T. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2009**, 636 (1-2), 18-23.
2. Dias, J. C.; Suzuki, E.; Albuquerque, C. L.; Ferreira, A. L.; Brito, A. R. M. S.; Kubota, L. T. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, 49 (4), 1128-1132.
3. Borges, A. C.; Dias, J. C.; Machado, W.; Sella, S. M.; Patchineelam, S. R. Distribuição espacial de ferro, cobre e chumbo em sedimentos de manguezal em um gradiente de degradação na Baía de Guanabara (Estado do Rio de Janeiro). *Química Nova* **2007**, 30 (1), 66-69.
4. Dias, J. C.; Rebelo, M. M.; Alves, C. N. A semi-empirical study of biflavonoid compounds with biological activity against tuberculosis. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2004**, 676 (1-3), 83-87.

Trabalhos Apresentados em Eventos

1. Nesterenko, P. N.; Dias, J. C.; Dicoski, G. W.; Kubota, L. T.; Haddad, P. R. Determination of trace metals in ethanol fuel by high-performance chelation ion chromatography with post column reaction and photometric detection. In: *21st International Ion Chromatography Symposium*. Dublin (Ireland). Book of Abstracts, p. 114-115, 2009.
2. Vidotti, M.; Dias, J. C.; Kubota, L. T. Nickel(II) hydroxide-modified glassy carbon electrode as a highly sensitive electrochemical detector for carbohydrates. In: *20th International Ion Chromatography Symposium*. Portland (OR, USA). Book of Abstracts, p. 131, 2008.
3. Dias, J. C.; Mano, E. C. C.; Kubota, L. T. Determination of nitrate and acetate in Brazilian ethanol fuel by ion chromatography with suppressed conductivity detection. In: *20th International Ion Chromatography Symposium*. Portland (OR, USA). Book of Abstracts, p. 105, 2008.

4. Dias, J. C.; Suzuki, E.; Albuquerque, C. L.; Ferreira, A. L.; Brito, A. R. M. S.; Kubota, L. T. Emprego da cromatografia de exclusão de íons na determinação de acetato, propionato e butirato em extratos fermentados de fibras alimentares. In: *14^o Encontro Nacional de Química Analítica*. João Pessoa (PB). CD-Rom do Evento, 2007.
-

PREMIAÇÕES ACADÊMICAS

1. Destaque da Iniciação Científica na Área de Ciências Exatas e da Terra. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará. 2003.
 2. Melhor Apresentação Oral do Centro de Ciências Exatas e Naturais. XIV Seminário de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/UFGA. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará. 2003.
-

ATIVIDADES DIDÁTICAS

Faculdade de Americana, FAM, Americana (SP)

Período: 10/2007-12/2008

Disciplinas ministradas no Curso de Engenharia Ambiental:

1. Físico-Química Ambiental
2. Química Ambiental
3. Química Orgânica Experimental

Obs. Este exercício de atividades didáticas foi previamente autorizado pela FAPESP de acordo com as normas vigentes.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE ACETATO, NITRATO, FERRO(II), FERRO(III) E COBRE EM ETANOL COMBUSTÍVEL POR CROMATOGRÁFIA DE ÍONS. O contexto geral deste trabalho se insere na área de desenvolvimento de métodos analíticos para a separação cromatográfica e detecção de íons em biocombustíveis. Diversos procedimentos de otimização (uni e multivariada) foram executados inicialmente visando estabelecer as melhores condições para uma separação eficiente e seletiva dos diferentes analitos. Posteriormente, os principais parâmetros analíticos foram investigados a fim de avaliar o desempenho e a aplicabilidade de cada método pré-estabelecido. Ao todo, três metodologias foram otimizadas, validadas e aplicadas para a análise de bioetanol, sendo a primeira para a determinação dos íons acetato e nitrato e as demais para a determinação dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre (sistemas de eluição à base dos ácidos dipicolínico e quelidâmico). As técnicas de cromatografia líquida por troca iônica com detecção condutimétrica (CLTI-DC) e cromatografia líquida por quelação de íons com detecção fotométrica (CLQI-DF) foram utilizadas para os compostos aniônicos e os íons metálicos, respectivamente. De maneira geral, os resultados obtidos evidenciaram o desempenho analítico satisfatório para os três métodos desenvolvidos. Com exceção do ferro(II), todos os demais analitos apresentaram baixos níveis de detectabilidade, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente, diversas amostras de álcool etílico hidratado combustível (AEHC) foram analisadas diretamente, sem a necessidade de pré-tratamento, para demonstrar a aplicabilidade de cada método.

Palavras-chave: Cromatografia, Troca iônica, Quelação, Etanol combustível.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ACETATE, NITRATE, IRON(II), IRON(III) AND COPPER IN FUEL ETHANOL USING ION CHROMATOGRAPHY. The overall context of this work is in the area of development of analytical methods for the chromatographic separation and detection of ions in biofuels. Several optimization procedures (uni- and multivariate) were performed initially in order to establish the best conditions for an efficient and selective separation of different analytes. Subsequently, the main analytical parameters were investigated to assess the performance and applicability of each method. In all, three methods were optimized, validated and applied to the analysis of fuel ethanol, the first being for the determination of nitrate and acetate and the others for the determination of iron(II), iron(III) and copper (eluent based on dipicolinic and chelidamic acids). The techniques of high performance ion-exchange chromatography with conductivity detection (HPIEC-CD) and high performance chelation ion chromatography with photometric detection (HPCIC-PD) were used for the anionic compounds and metal ions, respectively. Overall, the results showed good analytical performance for the three methods developed. With the exception of the iron(II), all other analytes were detected at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels. Finally, several samples of hydrated fuel ethanol were analyzed with no pretreatment to demonstrate the applicability of each method.

Keywords: Chromatography, Ion exchange, Chelation, Fuel ethanol.

ÍNDICE GERAL

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS	xxiv
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
CAPÍTULO I <i>Introdução</i>	1
I.1 ASPECTOS GERAIS	3
I.2 BREVE HISTÓRICO DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS	6
I.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
I.3.1 EVOLUÇÃO DA INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA	8
I.3.1.1 Fases estacionárias e sistemas de eluição	10
I.3.1.2 Técnicas de detecção	17
<i>I.3.1.2.1 Detecção condutimétrica</i>	17
<i>I.3.1.2.2 Detecção amperométrica</i>	18
<i>I.3.1.2.3 Detecção fotométrica</i>	20
<i>I.3.1.2.4 Detecção por espectrometria de massas</i>	21
I.3.2 ETANOL COMBUSTÍVEL	23
CAPÍTULO II <i>Objetivos</i>	33
II.1 GERAL	35
II.2 ESPECÍFICOS	35

CAPÍTULO III <i>Material e Métodos</i>	37
III.1 TRABALHOS PRELIMINARES	39
III.2 INFRAESTRUTURA	39
III.2.1 EQUIPAMENTOS	39
III.2.2 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	40
III.2.2.1 Ânions	40
III.2.2.2 Cátions	41
III.2.3 REAGENTES E SOLUÇÕES	42
III.2.3.1 Ânions	42
III.2.3.2 Cátions	43
III.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	47
III.3.1 OTIMIZAÇÃO	47
III.3.1.1 Ânions	51
III.3.1.2 Cátions	52
III.3.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS	53
CAPÍTULO IV <i>Resultados e Discussão: Íons Acetato e Nitrato</i>	55
IV.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	57
IV.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO	69
CAPÍTULO V <i>Resultados e Discussão: Íons Metálicos – Sistema ADPC</i>	75
V.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	77
V.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	77
V.1.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADPC	81
V.1.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HCl	86
V.1.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MeOH	91

V.1.5	EFEITO DA TEMPERATURA DA COLUNA	96
V.1.6	EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL	101
V.1.7	INTERFERÊNCIA DE OUTROS METAIS	105
V.2	VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO	110
 CAPÍTULO VI <i>Resultados e Discussão: Íons Metálicos – Sistema AQLD</i>		117
VI.1	OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	119
VI.1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	119
VI.1.2	EFEITO DA ACIDEZ DO MEIO – ELUENTE SEM TEA	120
VI.1.3	EFEITO DA ACIDEZ DO MEIO – ELUENTE COM TEA	129
VI.1.4	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MeOH	134
VI.1.5	EFEITO DA TEMPERATURA DA COLUNA	137
VI.1.6	EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL	143
VI.1.7	INTERFERÊNCIA DE OUTROS METAIS	146
VI.2	VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO	152
 CAPÍTULO VII <i>Conclusões Gerais</i>		163
 CAPÍTULO VIII <i>Referências Bibliográficas</i>		167

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila
ADPC: ácido dipicolínico
AEAC: álcool etílico anidro combustível
AEHC: álcool etílico hidratado combustível
AIDA: ácido iminodiacético
ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AQLD: ácido quelidâmico
ASTM: Sociedade Americana para Testes e Materiais
CI: cromatografia de íons
CLQI: cromatografia líquida por quelação de íons
CLTI: cromatografia líquida por troca iônica
D.I.: diâmetro interno
DAP: detecção amperométrica pulsada
DC: detecção condutimétrica
DF: detecção fotométrica
DPR: desvio padrão relativo
EAM: espectrofotometria de absorção molecular
ECS: Comitê Europeu de Normalização
EM-PAI: espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
PAR: 4-(2-piridilazo)resorcinol
PEEK: polieteretercetona
PS-DVB: copolímero de poliestireno-divinilbenzeno
PTFE: politetrafluoretileno (teflon)
PVA: álcool polivinílico
PVC: cloreto de polivinila
RPC: reagente pós-coluna
TEA: trietanolamina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns progressos alcançados durante a evolução da instrumentação analítica em CI ³⁹ .	9
Tabela 2. Normas oficiais para o controle de contaminantes químicos inorgânicos em etanol combustível.	26
Tabela 3. Métodos analíticos alternativos para a determinação de contaminantes aniônicos em etanol combustível.	28
Tabela 4. Métodos analíticos alternativos para a determinação de contaminantes metálicos em etanol combustível.	29
Tabela 5. Características gerais das colunas cromatográficas utilizadas para a determinação de ânions.	41
Tabela 6. Características gerais das colunas cromatográficas utilizadas para a determinação de íons metálicos.	42
Tabela 7. Sistemas de eluição utilizados durante a etapa inicial de otimização da separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato de acordo com a coluna utilizada. Condições fixadas: eluição isocrática a 0,7 mL min ⁻¹ na coluna Metrosep A Supp 5, mantida à temperatura ambiente (27-30°C), e eluição isocrática a 1,0 mL min ⁻¹ na coluna Metrosep A Supp 10, mantida a 45°C.	43
Tabela 8. Fórmulas estruturais dos agentes quelantes constituintes das fases estacionária e móvel, empregados na separação cromatográfica dos íons metálicos, com os respectivos logaritmos de suas constantes de dissociação ^{175,176} .	44
Tabela 9. Constantes de estabilidade de complexos de íons metálicos com os ácidos iminodiacético (AIDA), dipicolínico (ADPC) e quelidâmico (AQLD) em soluções aquosas ¹⁷⁸⁻¹⁸² .	47
Tabela 10. Fatores estudados e seus respectivos níveis para o planejamento fatorial completo 2 ⁴ com quadruplicata no ponto central.	51
Tabela 11. Matriz utilizada e resultados obtidos para o planejamento fatorial completo 2 ⁴ com quadruplicata no ponto central. Experimentos realizados em ordem aleatória.	63
Tabela 12. Condições finais otimizadas através do planejamento fatorial completo 2 ⁴ com quadruplicata no ponto central para a separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato em etanol.	68

Tabela 13. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons acetato e nitrato em meio etanólico. 70

Tabela 14. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons metálicos em meio etanólico – Sistema ADPC. 110

Tabela 15. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons metálicos em meio etanólico – Sistema AQLD. 153

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Viscosidades de misturas de solventes em função da composição ¹⁷⁷. 46
- Figura 2.** Variação no fator de retenção de cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. (a) Coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (27-30°C) – eluição isocrática a 0,7 mL min⁻¹. (b) Coluna Metrosep A Supp 10 (100 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C – eluição isocrática a 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Soluções padrão multicomponentes preparadas com o próprio eluente contendo 10 mg L⁻¹ de cada composto. 58
- Figura 3.** Variação no número de pratos para cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 2. 59
- Figura 4.** Variação no fator de assimetria de cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 2. 60
- Figura 5.** Cromatogramas sobrepostos ilustrando a comparação dos três sistemas de eluição avaliados com a coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (27-30°C). Eluição isocrática a 0,7 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Soluções padrão multicomponentes preparadas com o próprio eluente contendo 10 mg L⁻¹ de cada analito. 61
- Figura 6.** Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de k (fator de retenção) para o íon acetato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1 e 4. 64
- Figura 7.** Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de k (fator de retenção) para o íon nitrato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 4, 12 e 14. 65
- Figura 8.** Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de N (número de pratos) para o íon acetato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14, 23, 24, 134 e 1234. 66
- Figura 9.** Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de N (número de pratos) para o íon nitrato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com

quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 3, 4, 14, 23, 24, 34, 124, 134, 234 e 1234. 67

Figura 10. Cromatograma ilustrando a separação dos íons acetato e nitrato nas condições otimizadas através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C. Eluente composto por uma solução mista de Na_2CO_3 a 3,2 mmol L^{-1} , NaHCO_3 a 1 mmol L^{-1} e ACN a 10%, sob eluição isocrática a 0,7 mL min^{-1} . Volume de injeção de 20 μL . Solução padrão multicomponente preparada com o próprio eluente contendo 10 mg L^{-1} de cada analito. 69

Figura 11. Curva analítica obtida para o íon acetato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,05-10 mg L^{-1} (n = 11). 70

Figura 12. Curva analítica obtida para o íon nitrato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L^{-1} (n = 11). 71

Figura 13. Curva analítica obtida para o íon cloreto nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L^{-1} (n = 11). 71

Figura 14. Curva analítica obtida para o íon sulfato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L^{-1} (n = 11). 72

Figura 15. Cromatograma ilustrando a separação dos íons acetato e nitrato juntamente com os íons cloreto e sulfato nas condições previamente otimizadas, de acordo com a Tabela 12. Solução padrão multicomponente preparada em etanol puro contendo 0,5 mg L^{-1} de cada analito. 73

Figura 16. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes aniônicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) nas condições previamente otimizadas, de acordo com a Tabela 12. Concentrações determinadas para cada analito, em mg L^{-1} : 5,8 de acetato, 0,15 de cloreto, 0,015 de nitrato e 0,46 de sulfato. 74

Figura 17. Estruturas dos complexos metálicos do ácido iminodiacético (AIDA). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração. 78

Figura 18. Estruturas dos complexos metálicos do ácido dipicolínico (ADPC). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração. 79

Figura 19. Dependência linear da razão Fe(III)/Fe(II) em função do tempo. 81

Figura 20. Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (23-25°C). Eluente à base de ADPC, com pH ajustado para 2 com solução de HCl, sob eluição isocrática a 0,8 mL min^{-1} . Volume de injeção de 20 μL . Vazão do RPC de 0,36 mL min^{-1} . Soluções padrão multielementares preparadas com o próprio eluente contendo aproximadamente 6,7 mg L^{-1} de cada elemento. 82

- Figura 21.** Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. 82
- Figura 22.** Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. 83
- Figura 23.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. Eluente contendo ADPC na concentração de 2 mmol L^{-1} . 85
- Figura 24.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. Eluente contendo ADPC na concentração de 3 mmol L^{-1} . 85
- Figura 25.** Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$), mantida a 30°C . Eluente composto por uma solução mista de ADPC a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e MeOH a 20%, sob eluição isocrática a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento. 87
- Figura 26.** Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. 88
- Figura 27.** Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. 88
- Figura 28.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. Eluente contendo HCl na concentração de 5 mmol L^{-1} . 90
- Figura 29.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. Eluente contendo HCl na concentração de 10 mmol L^{-1} . 91
- Figura 30.** Efeito da concentração de metanol sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$), mantida a 30°C . Eluente composto por uma solução mista de ADPC a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e HCl a 5 mmol L^{-1} , sob eluição isocrática a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento. 92
- Figura 31.** Efeito da concentração de metanol sobre o número de pratos do íon ferro(II). Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. 93
- Figura 32.** Efeito da concentração de metanol sobre o fator de assimetria do íon ferro(II). Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. 93

- Figura 33.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. Eluente contendo 40% de MeOH. Resolução entre os picos de ferro(III) e cobre igual a 0,49. 94
- Figura 34.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. Eluente contendo 60% de MeOH. Resolução entre os picos de ferro(III) e cobre igual a 0,52. 95
- Figura 35.** Gráfico de van't Hoff. Efeito da temperatura da coluna sobre a retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹, HCl a 5 mmol L⁻¹ e MeOH a 60%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. 96
- Figura 36.** Efeito da temperatura da coluna sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. 99
- Figura 37.** Efeito da temperatura da coluna sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. 99
- Figura 38.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. Temperatura da coluna mantida em 40°C. 100
- Figura 39.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. Temperatura da coluna mantida em 45°C. 101
- Figura 40.** Curva de van Deemter. Efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C. Eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹, HCl a 5 mmol L⁻¹ e MeOH a 60%. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. *H*: altura de prato; *μ*: velocidade linear da fase móvel. 102
- Figura 41.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 40. Vazão da fase móvel de 0,5 mL min⁻¹. 104
- Figura 42.** Efeito da vazão da fase móvel sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 40. 104
- Figura 43.** Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse – Eluente A. 105
- Figura 44.** Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse – Eluente B. 106

Figura 45. Cromatograma ilustrando a separação de nove constituintes metálicos nas condições experimentais previamente otimizadas, descritas no diagrama da Figura 44. Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 2 de Pb, 1 de Cd, 1 de Co, 1 de Zn, 1 de Fe(III), 2 de Cu e 5 de Ni. 107

Figura 46. Cromatograma ilustrando a separação de nove constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Demais condições experimentais semelhantes às aquelas descritas na Figura 45. 108

Figura 47. Cromatograma ilustrando a separação de sete constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Vazão do RPC de 0,36 mL min^{-1} . Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 5 de Pb, 2 de Cd, 1 de Co, 1 de Zn, 1 de Fe(III), 2 de Cu e 4 de Ni. Demais condições experimentais semelhantes às aquelas descritas na Figura 45. Os picos artefatos que aparecem nos intervalos entre 4-5, 8-9 e 20-21 minutos se referem à passagem de bolhas pelo detector. 108

Figura 48. Curva analítica obtida para o zinco nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L^{-1} (n = 13) – Sistema ADPC. 111

Figura 49. Curva analítica obtida para o ferro(III) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L^{-1} (n = 11) – Sistema ADPC. 111

Figura 50. Curva analítica obtida para o cobre nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L^{-1} (n = 11) – Sistema ADPC. 112

Figura 51. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Concentrações estimadas para cada analito, em $\mu\text{g L}^{-1}$: 2,8 de zinco e 14 de cobre. 114

Figura 52. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Concentrações estimadas para cada analito, em $\mu\text{g L}^{-1}$: 2,8 de zinco e 9,1 de cobre. 114

Figura 53. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos adicionados (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada) em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra B – nas condições previamente otimizadas – Sistema ADPC. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,36 mL min^{-1} . O pico artefato que aparece próximo de 12 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector. 115

Figura 54. Estruturas dos complexos metálicos do ácido quelidâmico (AQLD). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração. 120

Figura 55. Cromatograma ilustrando o primeiro ensaio realizado com o sistema AQLD para a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (aprox. 25°C). Eluente composto por uma solução de AQLD a 4 mmol L⁻¹ em pH 2,5, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Solução padrão multielementar preparada com o próprio eluente contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento. 121

Figura 56. Cromatograma ilustrando o segundo ensaio realizado com o sistema AQLD para a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais empregadas no primeiro ensaio, mas desta vez o pH do eluente foi reduzido para 2. 122

Figura 57. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹ e MeOH a 30%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna. 124

Figura 58. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna. 125

Figura 59. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna. 125

Figura 60. Cromatograma ilustrando a eluição do ferro(II) no volume morto da coluna quando a concentração de HCl de 10 mmol L⁻¹ foi testada no eluente. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. PI representa o pico de injeção, referente à matriz etanólica. 127

Figura 61. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre juntamente com outros elementos na mesma concentração. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Eluente contendo HCl na concentração de 7 mmol L⁻¹. Pb e Ni não foram identificados nestas condições. 128

Figura 62. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹ e MeOH a 30%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento. 131

- Figura 63.** Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62. 131
- Figura 64.** Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62. 132
- Figura 65.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre juntamente com outros elementos na mesma concentração. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62. Eluente contendo HCl na concentração de 12 mmol L⁻¹. Pb e Ni não foram identificados nestas condições. 133
- Figura 66.** Efeito da concentração de metanol sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹ e HCl a 12 mmol L⁻¹, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. 135
- Figura 67.** Efeito da concentração de metanol sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66. 135
- Figura 68.** Efeito da concentração de metanol sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66. 136
- Figura 69.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66. Eluente contendo 50% de MeOH. O pico artefato que aparece próximo de 4 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector. 137
- Figura 70.** Gráfico de van't Hoff. Efeito da temperatura da coluna sobre a retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹, HCl a 12 mmol L⁻¹ e MeOH a 50%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. 138
- Figura 71.** Efeito da temperatura da coluna sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. 140
- Figura 72.** Efeito da temperatura da coluna sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. 141
- Figura 73.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. Temperatura da coluna mantida em 25°C. 142
- Figura 74.** Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. Temperatura da coluna mantida em 40°C. 142

Figura 75. Curva de van Deemter. Efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 40°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹, HCl a 12 mmol L⁻¹ e MeOH a 50%. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. *H*: altura de prato; *μ*: velocidade linear da fase móvel. 143

Figura 76. Efeito da vazão da fase móvel sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 75. 144

Figura 77. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 75. Vazão da fase móvel de 0,5 mL min⁻¹. Os picos artefatos que aparecem no intervalo entre 22-23 minutos e em 11 minutos se referem à passagem de bolhas pelo detector. 145

Figura 78. Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse. 147

Figura 79. Cromatograma ilustrando a separação de oito constituintes metálicos nas condições experimentais previamente otimizadas, descritas no diagrama da Figura 78. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,82 mL min⁻¹. Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L⁻¹: 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 10 de Pb, 1 de Cd, 2 de Fe(III), 1 de Zn, 1 de Co e 2 de Cu. Resolução entre os picos de Fe(III) e Cd igual a 0,94. 148

Figura 80. Cromatograma ilustrando a separação de sete constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L⁻¹: 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 10 de Pb, 2 de Fe(III), 0,5 de Zn, 0,5 de Co e 1 de Cu. Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 79. Nestas condições, o Cd pode coeluir com o Fe(III). 149

Figura 81. Cromatograma ilustrando a separação de oito constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L⁻¹: 0,5 de Mn, 5 de Fe(II), 10 de Pb, 2 de Cd, 5 de Fe(III), 5 de Zn, 1 de Co e 5 de Cu. Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 79. O pico artefato que aparece próximo de 14 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector. Resolução entre os picos de Fe(III) e Cd igual a 0,75. 150

Figura 82. Cromatograma parcial ilustrando a separação de sete constituintes metálicos nas condições cromatográficas otimizadas. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). As linhas preta e vermelha representam os comprimentos de onda de detecção de 510 e 715 nm, respectivamente. 151

Figura 83. Curva analítica obtida para o ferro(II) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 2,5-12,5 mg L⁻¹ (n = 5) – Sistema AQLD. 153

Figura 84. Curva analítica obtida para o ferro(III) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,05-7,5 mg L⁻¹ (n = 9) – Sistema AQLD. 154

Figura 85. Curva analítica obtida para o zinco nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 11) – Sistema AQLD. 154

Figura 86. Curva analítica obtida para o cobre nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 10) – Sistema AQLD. 155

Figura 87. Cromatogramas obtidos para soluções padrão contendo 5 mg L⁻¹ de ferro(II) em etanol, analisadas pelos diferentes métodos desenvolvidos. Vazão da fase móvel de 0,5 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. (a) Sistema ADPC: Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C, eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹, HCl a 10 mmol L⁻¹ e MeOH a 60%. (b) Sistema AQLD: Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 40°C, eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹, HCl a 12 mmol L⁻¹ e MeOH a 50%. 156

Figura 88. Cromatograma ilustrando a separação de cobre presente em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,82 mL min⁻¹. Concentração estimada para o cobre: 11 µg L⁻¹. 159

Figura 89. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos adicionados (20 µg L⁻¹ de cada) em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra B – nas condições previamente otimizadas – Sistema AQLD. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. 159

CAPÍTULO I

Introdução

I.1 ASPECTOS GERAIS

Ao longo do tempo a química analítica vem enfrentando diversos desafios relacionados ao desenvolvimento de técnicas e métodos cada vez mais eficientes e acessíveis, que possibilitem o monitoramento ambiental e o controle da qualidade de bebidas, gêneros alimentícios, medicamentos, combustíveis, entre outros. Neste contexto, as técnicas cromatográficas têm um papel fundamental na solução desses problemas.

As diversas técnicas cromatográficas são capazes de resolver a maioria dos problemas analíticos. Gases e substâncias voláteis podem ser determinados por cromatografia gasosa (CG); compostos orgânicos de massa molecular baixa ou elevada podem ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); misturas de compostos iônicos ou ionizáveis podem ser separadas por cromatografia de íons (CI), por técnicas cromatográficas de par iônico ou, ainda, por eletroforese capilar (EC); a separação de macromoléculas (polímeros e biopolímeros, por exemplo) é realizada por cromatografia de permeação em gel (CPG), também conhecida por cromatografia de exclusão por tamanho, enquanto a separação de isômeros ópticos pode ser executada por cromatografia quiral.

Dentre as diversas técnicas cromatográficas supracitadas, aquelas envolvendo a separação de compostos iônicos ou ionizáveis, genericamente conhecidas por “cromatografia de íons” (CI), vem se destacando por sua alta versatilidade, sendo capazes de separar diferentes classes de elementos e compostos, como metais alcalinos e alcalino-terrosos, metais de transição, elementos terras raras, ânions simples (mono e polivalentes), ânions complexos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, uma variedade de carboidratos, entre outros.

De maneira geral, a finalidade da CI como uma técnica analítica é fornecer informações detalhadas sobre a composição iônica da amostra analisada. Uma vantagem particular da CI sobre as técnicas tradicionais é a possibilidade de separar simultaneamente espécies aniônicas e catiônicas¹⁻¹⁴. Entretanto, devido à disponibilidade de diversos métodos analíticos espectroscópicos, sensíveis e multielementares, baseados nas técnicas de espectrometria de absorção atômica (EAA), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (EEO-PAI) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (EM-PAI), a CI assume um papel menos dominante no campo de aplicação relacionado à determinação de íons metálicos¹⁵.

Conforme mencionado anteriormente, o termo “cromatografia de íons” é uma forma genérica de expressar os diversos métodos de separação cromatográfica envolvendo compostos iônicos ou ionizáveis. Para expressar um método cromatográfico de uma maneira mais adequada é necessário mencionar o mecanismo principal envolvido no processo de separação.

Diante do exposto, considerando que os mecanismos principais de interesse envolvem, basicamente, os processos de troca iônica e quelação de íons, mediante interações eletrostáticas e equilíbrios de complexação de íons metálicos, respectivamente, as técnicas cromatográficas objeto de estudo deste trabalho podem ser corretamente definidas como: (1) “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Troca Iônica” (HPIEC¹⁶⁻¹⁸, do inglês *High Performance Ion-Exchange Chromatography*), ou simplesmente “Cromatografia Líquida por Troca Iônica” (CLTI), e (2) “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Quelação de Íons” (HPCIC¹⁹⁻²¹, do inglês *High Performance Chelation Ion Chromatography*), ou simplesmente “Cromatografia Líquida por Quelação de Íons” (CLQI).

Portanto, a separação de misturas de ânions por CLTI é regida, basicamente, por interações eletrostáticas, governadas pela lei de Coulomb. Em geral, são empregadas fases estacionárias poliméricas funcionalizadas com grupamentos quaternários de amônio, que interagem seletivamente com os solutos iônicos carregados negativamente ¹⁶⁻¹⁸. O efluente da coluna cromatográfica é conduzido para um sistema de supressão de condutividade e, finalmente, direcionado ao detector.

Por outro lado, a separação cromatográfica de íons metálicos pode ser realizada sobre fases estacionárias funcionalizadas com grupamentos sulfônicos ou carboxílicos. No primeiro caso, o mecanismo de separação também envolve o processo de troca iônica através de interações eletrostáticas entre o grupo trocador e o íon de interesse. Já no segundo caso, podem ocorrer interações eletrostáticas e/ou reações de equilíbrio de complexação, dependendo do tipo de metal avaliado e da composição da fase móvel ¹⁷⁻²¹. As técnicas de detecção condutimétrica e fotométrica são as mais utilizadas para essa finalidade, sendo a segunda acompanhada, geralmente, de uma etapa de derivatização pós-coluna através do emprego de um reagente cromóforo.

I.2 BREVE HISTÓRICO DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS

No final da década de 1950 alguns pesquisadores da companhia Dow Physical Research Laboratory (Midland, MI, USA) presumiram os benefícios da determinação de íons inorgânicos através da substituição de diversos métodos clássicos de análise por uma única técnica cromatográfica. No entanto, o primeiro avanço ocorreu somente no final de 1971, quando Hamish Small e seus colegas propuseram e testaram um método cromatográfico para a determinação de Li^+ , Na^+ e K^+ em uma solução padrão a 10 mmol L^{-1} de cada cátion, baseado no processo de troca iônica empregando a detecção condutimétrica²²⁻²⁴. No mesmo ano, também foi efetuado um ensaio para a separação e detecção de íons cloreto e nitrato²³.

Posteriormente, a companhia Dow Chemical patenteou o sistema de supressão de condutividade e, subsequentemente, concedeu licença à empresa Durrum Instruments (Palo Alto, CA, USA), que mais tarde se transformou na companhia Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA), que foi a pioneira na comercialização de cromatógrafos de íons²².

Em setembro de 1975, durante uma reunião da *American Chemical Society*, a cromatografia de íons teve a sua primeira apresentação pública, ocasião na qual a companhia Dionex expôs o primeiro instrumento disponível comercialmente²³. Nesta mesma ocasião, Hamish Small e seus colegas apresentaram seu trabalho original sobre os conceitos fundamentais da técnica e diversos exemplos de sua aplicação²⁵. Eles propuseram o princípio da redução (ou supressão) da condutividade de fundo de um eluente com força iônica elevada através do uso de uma segunda coluna supressora sequencial, empregando uma fase estacionária de troca iônica de baixa capacidade e um detector de condutividade.

Mais tarde, Gjerde e colaboradores²⁶⁻²⁹ desenvolveram uma variedade de técnicas analíticas por cromatografia de íons sem supressão de condutividade. Eles mostraram que a supressão não era essencial para o aumento da sensibilidade do detector condutimétrico, desde que fossem utilizados eluentes de baixa condutância e fases estacionárias apropriadas de baixa capacidade de troca iônica.

Por outro lado, os princípios fundamentais relacionados à formação de complexos começaram a ser compreendidos e elucidados a partir dos estudos do cientista alemão Alfred Werner, em 1893³⁰. Mais tarde, em 1920, Gilbert Morgan e Harry Drew³¹ introduziram o conceito de quelação como sendo um tipo especial de complexação, considerando o processo de formação de complexos baseado em estruturas cíclicas com duas ou mais ligações entre os sítios ligantes. Entretanto, o princípio mais relevante foi estabelecido posteriormente por Lev Chugaev, que descobriu que compostos quelatos contendo anéis com cinco ou seis membros são normalmente mais estáveis quando se consideram as diferentes estruturas dos complexos. Desde então, a seletividade de muitos procedimentos analíticos usando regentes orgânicos foi melhorada significativamente, incluindo diferentes métodos de separação por cromatografia líquida, sobretudo para a determinação de elementos metálicos²⁰.

De acordo com dados do *SciFinder Scholar*, versão *on-line* do *Chemical Abstracts Service*, em torno de 7700 artigos sobre diferentes aspectos da CI foram publicados desde o trabalho pioneiro de 1975 até o final de 2009.

I.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.3.1 EVOLUÇÃO DA INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

Certamente, os avanços da CI, assim como de qualquer técnica instrumental, se devem ao trabalho de grupos de ‘Pesquisa & Desenvolvimento’ que têm a notável habilidade de aliar a química e a instrumentação para resolver problemas práticos.

Desde o estabelecimento da CI como uma técnica analítica, a evolução de sua instrumentação foi voltada, sobretudo, para a melhoria na eficiência das separações e na detectabilidade das medidas. Assim, os principais avanços desta técnica incluem o desenvolvimento de novas fases estacionárias ^{6,10,32-35} e a evolução dos sistemas de detecção ³⁶⁻³⁸.

Uma relação de alguns progressos alcançados durante a evolução da instrumentação analítica nos sistemas cromatográficos para a separação de compostos iônicos e ionizáveis é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns progressos alcançados durante a evolução da instrumentação analítica em CI³⁹.

Progresso alcançado	Efeito gerado
○ Eluição por gradiente	○ Aumento do número de íons separados em uma única corrida cromatográfica, reduzindo, desta forma, o tempo de análise
○ Introdução de bombas e tubos capilares de material não metálico, por exemplo, PEEK (polieteretercetona), PTFE (politetrafluoretileno), safira, etc.	○ Melhoria na exatidão da determinação de íons metálicos e íons relacionados, além da redução da corrosão de instrumentos
○ Automatização da filtração de amostras “on-line” para evitar a entrada de material particulado no sistema cromatográfico	○ Prolongamento do tempo de vida útil de colunas cromatográficas
○ Introdução de novos tipos de detectores, incluindo DAP, EM-PAI, etc.	○ Expansão das áreas de aplicação da CI, em particular, a determinação de carboidratos, aminoácidos, aminas biogênicas, álcoois, fenóis, etc.
○ Separação simultânea e detecção de cátions e ânions	○ Possibilidade de se obter informações completas sobre a composição iônica da amostra analisada
○ Melhorias constantes dos sistemas de supressão para a detecção condutimétrica	○ Obtenção de baixos níveis de detectabilidade
○ Desenvolvimento do sistema RFIC (do inglês, <i>Reagent-Free IC</i>) com gerador de eluente	○ Possibilidade de manipular eletronicamente a concentração do eluente
○ Desenvolvimento de fases estacionárias monolíticas	○ Separações ultra-rápidas, particularmente, a separação de oito ânions (H_2PO_4^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- , I^- , SO_4^{2-}) em aproximadamente 15 segundos

A miniaturização de instrumentos também é uma tendência comum de todas as técnicas cromatográficas. Os progressos mais significativos são observados em CG, CLAE e CI. Cromatógrafos de campo e dispositivos portáteis, além de instrumentos à base de *chips*, são desenvolvidos atualmente^{2,39,40}.

De maneira geral, diversos fatores, como a natureza da fase estacionária, a composição da fase móvel e o método de detecção empregado, são fundamentais para o controle e a manipulação da seletividade em qualquer técnica de cromatografia líquida devido à ampla diversidade de materiais, reagentes e sistemas de detecção disponíveis. Assim, a combinação das diversas seletividades, avaliadas por cada fator individualmente, resulta na capacidade de se analisar algumas matrizes mais complexas⁴¹⁻⁴⁶.

As diversas aplicações da CI representam a força propulsora responsável por seu crescimento nos últimos anos. Uma extensa literatura, incluindo livros e periódicos, pode ser encontrada descrevendo métodos e aplicações desta técnica em diversas áreas^{3,16-18,22,47-61}.

I.3.1.1 Fases estacionárias e sistemas de eluição

O desenvolvimento de novas fases estacionárias e sistemas de eluição vêm ocorrendo no sentido de ampliar a faixa de aplicação da CI para matrizes mais complexas, de reduzir o tempo de análise e de melhorar a seletividade analítica^{6,10,32-35}. Alguns avanços nestas áreas são descritos, resumidamente, a seguir.

As fases estacionárias empregadas em CI são, em geral, à base de sílica ou resinas poliméricas, embora outros materiais suporte, por exemplo, alumina, também sejam utilizados^{33,62,63}. No entanto, ao contrário dos enchimentos à base de sílica-C18 usados, geralmente, em colunas para CLAE, as resinas poliméricas são,

predominantemente, empregadas como material suporte em CI. Entre estas, as principais são: copolímero de estireno-divinilbenzeno (ES-DVB), álcool polivinílico (PVA) e polimetacrilato (PMMA). Estes materiais apresentam uma estabilidade muito mais elevada em condições de pH extremo, enquanto as colunas à base de sílica devem ser usadas em uma faixa de pH mais estreita, compreendida, geralmente, entre 2 e 8. Por outro lado, as resinas poliméricas, por serem materiais semi-rígidos, não resistem a pressões elevadas, ao contrário dos sólidos rígidos à base de sílica, que resultam em enchimentos estáveis e colunas, em geral, mais eficientes^{16-18,63}.

De maneira geral, as fases estacionárias usadas em CI diferem não somente em relação ao tipo de material suporte empregado, mas também de acordo com a porosidade das partículas e a capacidade de troca iônica.

Com os avanços no conhecimento sobre os processos que ocorrem na superfície de fases estacionárias houve um aumento significativo no número de materiais empregados como trocadores iônicos. Consequentemente, atualmente existem diversas colunas disponíveis comercialmente para CI, embora sejam produzidas por um pequeno número de fabricantes, com seletividades extremamente diferentes, o que acaba gerando, muitas vezes, controvérsias na literatura^{33,34}.

Os principais fabricantes ou fornecedores de colunas para CI são: Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA), Metrohm AG (Herisau, Suíça) e Alltech Associates Inc (Deerfield, IL, USA). Os custos dessas colunas são, em geral, comparáveis aos custos de colunas para CLAE. No entanto, o consumo de reagentes e a geração de resíduos em CI são bem menores, considerando que, na maioria das vezes, a fase móvel é composta por uma solução aquosa salina muito diluída¹⁶⁻¹⁸.

Vários estudos têm sido realizados para viabilizar a separação simultânea de cátions e ânions com o objetivo de minimizar o trabalho analítico, o consumo de tempo e o custo de materiais necessários à análise^{3-6,9,11,13,14,64}. No entanto, geralmente, os métodos cromatográficos utilizados para determinar a composição iônica total (cátions e ânions) de uma amostra envolvem a aplicação de duas corridas cromatográficas paralelas, baseadas em diferentes metodologias. Uma alternativa útil para a separação simultânea (em uma mesma corrida) de cátions e ânions é o emprego de duas colunas cromatográficas conectadas em série, sendo uma responsável pela troca aniônica e a outra pela troca catiônica. Desta forma, é necessário somente um eluente, no modo isocrático, e um único sistema de detecção^{56,64,65}.

Por outro lado, diversos grupos de pesquisa estão envolvidos com o desenvolvimento de novas fases estacionárias capazes de separar simultaneamente espécies aniônicas e catiônicas^{4-8,15,32,33,66,67}. Neste contexto, se inserem as fases estacionárias zwitteriônicas, que possuem compostos aminoácidos ligados covalentemente à superfície de um substrato. Estes materiais contêm grupos eletricamente neutros, que apresentam cargas formais negativas e positivas sobre átomos diferentes. Desta maneira, tanto as interações eletrostáticas atrativas quanto as repulsivas são exercidas sobre os solutos eletricamente carregados.

Fases estacionárias menos convencionais também têm sido desenvolvidas para aplicações em técnicas cromatográficas de maneira geral, incluindo a CI. Um avanço recente no desenvolvimento de vários materiais associados a diamantes (DRMs, do inglês *diamond-related materials*) tem gerado um grande interesse na sua utilização como fase estacionária em diferentes técnicas de separação por apresentarem muitos requisitos necessários a essa finalidade, incluindo excelente estabilidade química e mecânica, elevada estabilidade térmica, baixa reatividade

química e biocompatibilidade ⁶⁸. Neste contexto, Nesterenko *et al.* ⁶⁹ descreveram um trabalho pioneiro sobre a separação cromatográfica de mistura de cátions através do emprego de nanodiamantes sintéticos como fase estacionária em CI com seletividade similar aquela de trocadores catiônicos funcionalizados com grupos carboxila.

Outros avanços na área de desenvolvimento de novos materiais para fases estacionárias estão sendo feitos. Entre estes, destacam-se as fases estacionárias monolíticas ⁷⁰⁻⁷⁵ e quelantes ^{34,76-79}.

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação, podendo ser à base de sílica ou resina polimérica, comumente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem alta permeabilidade e elevada eficiência de separação ^{71,73}.

Atualmente, algumas colunas monolíticas à base de sílica-C18 são disponíveis comercialmente para a CLAE. Desta forma, foi possível o emprego da técnica de cromatografia líquida por interação iônica (CLII) para a separação de íons orgânicos e inorgânicos com eficiência e resolução satisfatórias ⁷². Neste tipo de cromatografia, a separação dos constituintes iônicos ocorre devido à presença de um reagente de interação iônica, geralmente à base de tetrabutylamônio (TBA), que faz parte da composição da fase móvel.

Baseado no mecanismo de interação iônica, Hatsis e Lucy ⁷² usaram uma coluna monolítica à base de sílica-C18 (Merck Chromolith[®] Speed ROD RP-18, 50 x 4,6 mm D.I.) para demonstrar o seu potencial no monitoramento em tempo real de processos químicos. Desta forma, utilizando uma amostra de água de fonte industrial, oito ânions foram separados em somente 15 segundos a uma vazão de 16 mL min⁻¹. Entretanto, como este método utilizou o modo de detecção por condutividade direta, ou seja, sem supressão, a sua detectabilidade se limitou ao

nível de mg L^{-1} , o que muitas vezes não é adequado para amostras reais. Por isso, o íon H_2PO_4^- não pôde ser quantificado, por estar em níveis abaixo do limite de quantificação do método, além de interferir na determinação do íon Cl^- .

As pesquisas sobre fases estacionárias monolíticas funcionalizadas para uso CI ainda estão no estágio de desenvolvimento. Para a determinação de compostos iônicos e moléculas pequenas, as estruturas de sílica-C18 foram modificadas com surfactantes iônicos para formar fases estacionárias de troca aniônica⁸⁰ ou catiônica⁷⁵ apropriadas para a cromatografia rápida de íons.

Utilizando uma coluna monolítica à base de sílica-C18, modificada com um surfactante à base de brometo de didodecildimetilamônio (DDAB), Hatsis e Lucy⁸⁰ realizaram uma separação cromatográfica por troca iônica de alta velocidade. Assim, utilizando também uma amostra de água de fonte industrial, sete ânions foram separados em 30 segundos a uma vazão máxima de 10 mL min^{-1} . Neste caso, foi utilizado o modo de detecção por supressão de condutividade, obtendo-se, assim, limites de detecção da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, este tipo de detecção funciona muito bem somente com eluentes que apresentam um $\text{p}K_a > 7$, ou seja, eluentes alcalinos, os quais, por sua vez, são incompatíveis com este tipo de fase estacionária à base de sílica, limitando, desta forma, a otimização da composição da fase móvel, que neste caso foi uma solução de *o*-cianofenol, um ácido orgânico aromático que apresenta uma baixa condutividade equivalente.

O desenvolvimento e a aplicação de fases estacionárias quelantes são descritos na literatura para a separação de diversos elementos metálicos em diferentes tipos de amostras^{34,59,76-79,81-84}. Em 2006, por exemplo, Blazewicz *et al.*⁸⁴ desenvolveram e aplicaram uma nova fase estacionária quelante, funcionalizada com o ácido calconcarboxílico, para separar quantidades traço de alguns metais

pesados em amostras biológicas, usando como agentes complexantes no eluente os ácidos oxálico e dipicolínico, sob eluição isocrática.

Embora existam diversos tipos de grupos quelantes que podem ser usados sobre fases estacionárias, particularmente, os substratos funcionalizados com o grupamento ácido iminodiacético (AIDA) têm demonstrado excelentes resultados para a eficiência e a seletividades de separações cromatográficas variadas. Este ácido, quando ligado covalentemente a pequenas partículas esféricas de sílica, pode fornecer eficiências cromatográficas próximas às aquelas obtidas com substratos convencionais de fase reversa (C18) ^{77,82,85-88}. Neste contexto, Nesterenko e Shpigun ⁷⁷ descrevem em seu trabalho o comportamento cromatográfico de diferentes tipos de metais (alcalino-terrosos, transição, pesados e terras raras) sobre fases estacionárias complexantes contendo o grupo funcional AIDA. Em linhas gerais, os autores avaliaram como a eficiência e a seletividade da separação dos íons metálicos selecionados são afetadas pelo tipo de interação metal-ligante, pela matriz (substrato) da fase estacionária, pela composição do eluente e pela temperatura da coluna cromatográfica. Além disso, eles também explicam que, sob condições otimizadas, é possível prever a ordem de retenção dos analitos com base nos valores das constantes de estabilidade dos complexos formados, o que possibilita a escolha do sistema cromatográfico mais adequado para aplicações práticas.

Quando as propriedades complexantes singulares de uma fase estacionária quelante são combinadas com eluentes contendo ácidos carboxílicos multifuncionais podemos obter um sistema cromatográfico poderoso e versátil para uma ampla variedade de aplicações ⁸⁹. Portanto, tão importante quanto a fase estacionária, a fase móvel também possui um papel fundamental no processo de separação cromatográfica em fase líquida. Neste sentido, alguns trabalhos foram

realizados a fim de otimizar a composição de sistemas de eluição para aplicações diversas ^{44,46,86,89-92}. Entretanto, somente poucos reagentes complexantes foram usados até o presente em sistemas de eluição para CLQI, sobretudo os ácidos ascórbico, cítrico, dipicolínico, oxálico, picolínico e tartárico, os quais formam complexos neutros ou aniônicos com os íons metálicos. Algumas vezes, uma mistura de dois ácidos orgânicos é usada a fim de otimizar uma separação particular ¹⁶⁻¹⁸.

Jones e Nesterenko ⁸⁹ publicaram um estudo detalhado a respeito da influência de diferentes reagentes complexantes na fase móvel sobre a seletividade da separação de vários elementos metálicos separados por CLQI usando fases estacionárias à base de sílica funcionalizada com o grupamento AIDA. Neste estudo, os autores mostraram que o equilíbrio de complexação metálica entre o grupo ligante do eluente e o grupo quelante ligado à superfície da fase estacionária representa uma poderosa forma de controlar a seletividade da separação cromatográfica de determinados metais. Particularmente, a retenção do Cd é controlada pelo íon cloreto enquanto a retenção dos íons Cu(II), Fe(III) e Pb é controlada pelos ácidos picolínico, oxálico e dipicolínico, respectivamente. Assim sendo, o tipo de agente quelante empregado em CLQI é um fator determinante na seletividade da separação de elementos metálicos.

Assim como o tipo de agente quelante usado no eluente, sua concentração e o pH da solução também influenciam fortemente na separação cromatográfica de íons metálicos. Outros parâmetros, como o tipo e a concentração de modificador orgânico, assim como a temperatura da coluna, igualmente podem influenciar no processo de separação ^{44,86}.

I.3.1.2 Técnicas de detecção

As técnicas de detecção mais empregadas em CI são: condutividade elétrica (com ou sem supressão), amperometria (potencial fixo ou pulsado), espectrofotometria de absorção molecular (com reação pós-coluna) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente¹⁶⁻¹⁸.

Os principais avanços que vêm ocorrendo nos sistemas de detecção empregados atualmente em CI são no sentido de diminuir os níveis de detectabilidade e aumentar a seletividade das medidas³⁶⁻³⁸.

I.3.1.2.1 Detecção condutimétrica

O modo de detecção por condutividade elétrica é o mais comumente empregado em CI, sendo considerado a técnica de detecção universal. Os mais importantes avanços nesta técnica estão relacionados ao desenvolvimento de novos supressores⁹³⁻¹⁰⁰, os quais são usados em conjunto com detectores condutimétricos a fim de melhorar a sensibilidade da detecção, especialmente para a determinação de ânions¹⁶⁻¹⁸.

Dependendo do mecanismo envolvido, existem diversos tipos de sistemas de detecção por supressão de condutividade, incluindo: supressão química de coluna recheada, supressão à base de membrana e supressão de CO₂⁹⁵. Assim, dois tipos de supressores são comumente usados atualmente para a determinação de ânions, os supressores de coluna recheada, regenerada intermitentemente, e os supressores à base de membrana, regenerada continuamente. No entanto, segundo Saari-Nordhaus e Anderson⁹⁷, os primeiros são mais robustos e confiáveis.

Em 2002, Saari-Nordhaus e Anderson ⁹⁸ desenvolveram um novo supressor de coluna recheada (Alltech DS-Plus[®]), que é regenerado eletroquimicamente de forma contínua. Este dispositivo tolera pressões mais elevadas e não requer água ou solução regenerante. Além disso, sua principal vantagem é a remoção do gás carbônico gerado após a supressão de eluentes à base de carbonato-bicarbonato, reduzindo, ainda mais, a condutividade de fundo, chegando a valores próximos de zero. Desta forma, além de melhorar a razão sinal-ruído e reduzir o pico de injeção, que frequentemente interfere na determinação dos íons fluoreto e acetato, também é possível realizar separações por gradiente com um deslocamento mínimo da linha de base.

No contexto geral, os detectores de condutividade contemporâneos possuem diversas características que possibilitam a obtenção de baixos níveis de detectabilidade e alta estabilidade. Entre elas, as mais importantes são: ruído eletrônico em torno de 0,2 nS, volume de célula de aproximadamente 1 µL e estabilidade de temperatura do forno da célula de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$. Entretanto, devido à sua falta de seletividade, a detecção condutimétrica é fortemente dependente da natureza da fase estacionária e da composição da fase móvel ^{16,18,36,37}.

1.3.1.2.2 Detecção amperométrica

A detecção amperométrica, tanto com potencial fixo quanto com potencial pulsado para produzir a corrente de detecção, é uma técnica altamente seletiva, ao contrário da condutimétrica, sendo amplamente utilizada em conjunto com a cromatografia de íons para a determinação de diversos compostos eletroativos, tanto orgânicos quanto inorgânicos ^{36,37,101}.

Neste contexto, os principais avanços que ocorreram nos últimos anos nesta técnica de detecção foram no sentido de desenvolver eletrodos quimicamente modificados que servissem como sensores para compostos iônicos que são eletroinativos em eletrodos convencionais^{36,37,102-105}.

Um exemplo interessante é o emprego de um eletrodo de ouro quimicamente modificado com um filme de poli-*o*-fenilenodiamina para a detecção amperométrica de alguns ânions (SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , F^- , H_3CCOO^- e PO_4^{3-}), separados por cromatografia de exclusão iônica¹⁰³. A detecção destes íons se baseia no fato de que a oxidação do polímero envolve a incorporação de uma espécie aniônica para contrabalancear os sítios positivos gerados no processo de oxidação. Portanto, em um determinado potencial de oxidação, a corrente flui somente quando os ânions passam pelo eletrodo. Assim, de maneira geral, as principais vantagens deste eletrodo são os baixos limites de detecção (da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹) e o período de estabilidade química e mecânica, em torno de duas semanas.

De forma análoga, Xu *et al.*¹⁰⁴ realizaram um estudo sobre o emprego de um eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com um filme de hexacianoferrato(II, III) de índio(III) e Nafion para a detecção amperométrica de alguns cátions (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ e NH_4^+), separados por CI. Neste caso, os limites de detecção também foram da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹. No entanto, os autores não comentam sobre o tempo de estabilidade deste sensor.

Mais recentemente, Vidotti *et al.*¹⁰² demonstraram a aplicabilidade de um sensor à base de carbono vítreo quimicamente modificado com hidróxido de níquel para a detecção amperométrica de compostos carboidratos em amostras de bebidas energéticas em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. Os compostos foram previamente separados por cromatografia de íons usando um eluente composto por uma solução de hidróxido de sódio a 100 mmol L⁻¹.

No contexto geral, o detector amperométrico possui uma série de vantagens em relação ao condutimétrico, incluindo limites de detecção da ordem de ng L^{-1} e alta seletividade. Entretanto, dependendo do eletrodo de trabalho, que pode ser à base de carbono, ouro, platina, prata, cobre, níquel ou paládio, e do tipo de modificação química, várias limitações podem ser observadas durante o processo de detecção do analito, por exemplo, a passivação do eletrodo, os altos sobrepotenciais para a oxidação ou redução de certos compostos, a lixiviação da modificação química, entre outras^{16,18,36,106}.

1.3.1.2.3 Detecção fotométrica

A espectrofotometria de absorção molecular (EAM), genericamente denominada de fotometria, é uma técnica analítica largamente empregada para a determinação de diversas classes de compostos. Em CI, esta técnica é utilizada, sobretudo, para a detecção de elementos metálicos. Neste caso, é necessário o emprego de um reator de mistura entre a saída da coluna cromatográfica e a entrada da cela de detecção. Uma solução reagente, denominada ‘reagente pós-coluna’, contendo um composto cromóforo, é impulsionada por uma bomba extra (em geral, peristáltica) para dentro do reator, onde irá encontrar o efluente da coluna em uma “válvula T”, sendo a mistura conduzida para um longo tubo capilar trançado onde ocorre a reação de complexação.

A principal desvantagem do acoplamento CI-EAM com sistema de reação pós-coluna é a possibilidade de geração de ruídos devido aos pulsos da bomba peristáltica, aumentando, desta forma, a instabilidade da linha de base e dificultando a detecção de elementos em baixas concentrações. Neste sentido, Jones¹⁰⁷ descreve em seu trabalho uma forma relativamente simples de contornar

esse problema através do emprego de dois comprimentos de onda simultaneamente, sendo um para monitorar o produto da reação e o outro definido próximo ao ponto isobéstico. Desta forma, após uma simples manipulação aritmética dos dados, o ruído da bomba é subtraído da linha de base, possibilitando uma melhora significativa na sensibilidade analítica.

O composto cromóforo mais usado em sistemas de reação pós-coluna para a complexação de metais polivalentes é o 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) em solução aquosa amoniacal, possibilitando a detecção de diversos elementos em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, outros reagentes cromóforos também podem ser utilizados a fim de aumentar a sensibilidade analítica das medidas¹⁰⁸⁻¹¹⁵. Neste contexto, o desenvolvimento de novas soluções reagentes para o sistema de reação pós-coluna do acoplamento CI-EAM para a quantificação de metais é um campo amplo de pesquisa relativamente pouco explorado.

1.3.1.2.4 Detecção por espectrometria de massas

Atualmente, a hifenização da cromatografia de íons com a espectrometria de massas (CI-EM) está bem estabelecida¹¹⁶, embora ainda seja pouco utilizada devido, principalmente, aos custos elevados.

Somente duas técnicas de ionização de amostras são relevantes no acoplamento CI-EM, incluindo: a ionização por plasma acoplado indutivamente (CI-EM-PAI), que funciona como um detector elemento-seletivo, e a ionização à pressão atmosférica (CI-EM-IPA), que pode ser usada para obter informações estruturais sobre os compostos³⁶.

Aqui será dada ênfase ao sistema CI-EM-PAI, considerando que este é o mais comumente empregado, sendo altamente seletivo, por exemplo, na identificação de espécies orgânicas e inorgânicas de arsênio, selênio, crômio, entre outros, em matrizes diversas.

De maneira geral, as principais características desta técnica hifenada são: a simplicidade do acoplamento físico, a sensibilidade singular para muitos compostos e a elevada seletividade para aplicações específicas. No entanto, segundo Seubert¹¹⁷, os pontos mais críticos de um PAI, hifenado a um cromatógrafo de íons, são: a câmara de spray e o nebulizador. Um requisito básico de um nebulizador é a sua compatibilidade com a vazão e a composição da fase móvel. Assim, eluentes aquosos são, frequentemente, danosos por seu conteúdo salino. Por outro lado, eluentes orgânicos, ou que contenham modificadores orgânicos, tendem a afetar a estabilidade do plasma devido ao aumento da pressão de vapor do solvente. Desta forma, a detecção por EM-PAI necessita, geralmente, de soluções tampões diluídas ou baixas concentrações de modificadores orgânicos.

Diante do exposto, os detectores convencionais em cromatografia de íons (condutimétrico, amperométrico e fotométrico) são mais simples e de menor custo, quando comparados ao detector de EM-PAI. Além disso, o cenário atual da hifenização CI-EM-PAI pode ser descrito por uma série de vantagens e limitações. Assim sendo, esta técnica é considerada mais sofisticada, mais complexa, mais custosa e, algumas vezes, mais difícil de manusear. Entretanto, a tendência atual de miniaturização de instrumentos gera perspectivas de redução nos custos, o que resultaria em um aumento significativo na disponibilidade destes equipamentos em laboratórios analíticos.

I.3.2 ETANOL COMBUSTÍVEL

O uso crescente de biocombustíveis como uma alternativa aos derivados do petróleo deverá ocasionar uma redução nas emissões líquidas de dióxido de carbono, o principal responsável pelo efeito estufa, em longo prazo. Além disso, combustíveis renováveis, como o etanol, por exemplo, são potencialmente menos poluentes, contribuindo para a preservação da saúde pública e do meio ambiente ¹¹⁸⁻¹²¹.

O etanol brasileiro, produzido em larga escala através do processo de destilação fracionada de extratos fermentados da sacarose de cana-de-açúcar, pode ser usado na forma hidratada (92,6 a 93,8 graus INPM) ou na forma anidra (99,3 graus INPM). A forma hidratada é denominada “álcool etílico hidratado combustível” (AEHC), sendo usada diretamente como um biocombustível automotivo. Já a forma anidra, denominada “álcool etílico anidro combustível” (AEAC), é utilizada como um aditivo na gasolina em substituição ao chumbo tetraetila ^{122,123}.

A produção brasileira de etanol visa primordialmente o abastecimento da frota nacional de veículos movidos a álcool. Adicionalmente, este produto tem sido empregado também em processos industriais como matéria-prima para a produção de importantes precursores orgânicos de alta importância na indústria química, como o eteno ^{124,125}.

Em ambos os casos, o conhecimento dos tipos de contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no etanol torna-se fundamental, tendo em vista que algumas dessas espécies, como os metais pesados, são nocivas à saúde e ao meio ambiente quando emitidas como poluentes durante o processo de combustão, além de

podem representar potenciais “venenos” para catalisadores, especialmente quando o etanol for utilizado em processos industriais ^{123,124}.

A contaminação do etanol combustível com substâncias inorgânicas, tais como, cloreto, sulfato, nitrato, cobre, ferro, sódio, entre outras, que podem surgir nas etapas de produção, transporte e/ou estocagem do produto, pode afetar o desempenho do motor automotivo, já que os sais e depósitos que são formados podem induzir o processo de corrosão nos componentes do veículo em contato direto com o álcool ¹²⁶⁻¹³¹.

Portanto, o controle de qualidade de combustíveis constitui uma questão de relevância econômica e ambiental, uma vez que combustíveis fora das especificações de qualidade trazem prejuízos diretos para o consumidor, através do mau funcionamento do motor automotivo, aumento do consumo de combustível e gastos com manutenção ¹¹¹.

A legislação sobre as especificações do etanol combustível brasileiro é determinada pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). De acordo com a Resolução ANP N° 36 ¹²², as concentrações de cobre e ferro em etanol combustível devem ser controladas pela técnica de espectrometria de absorção atômica (EAA) ¹³². No AEAC a concentração máxima permitida de cobre é $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ enquanto no AEHC a concentração de ferro é limitada ao máximo de 5 mg kg^{-1} .

Atualmente, não existe um limite de concentração estabelecido para o cobre em AEHC. Entretanto, a partir do ano de 2004, com o surgimento dos automóveis bicompostíveis, que podem ser abastecidos tanto com gasolina quanto com etanol, surge a importância de controlar a presença de cobre em AEHC, uma vez que este metal, quando misturado à gasolina, atua como um catalisador para a sua oxidação ^{133,134}.

A cromatografia de íons também é descrita pela ANP como uma técnica de referência para a determinação sequencial de íons cloreto e sulfato ¹³⁵. Entretanto, não existe especificação para os íons nitrato e acetato nos dois tipos de etanol. Todavia, o íon nitrato pode surgir na etapa de cultivo da cana-de-açúcar ou estar presente na água usada no processo de produção; sua presença favorece a formação de compostos oxidantes/corrosivos, além disso, sua redução a altas temperaturas, resultantes da queima do combustível, libera compostos tóxicos para o meio ambiente, por exemplo, NO e N₂O ^{136,137}. Por outro lado, o íon acetato pode ser produzido através da oxidação de moléculas de acetaldeído, indicando, desta forma, o nível de oxidação do álcool ¹³⁸⁻¹⁴¹.

Em nível internacional, as especificações para o etanol combustível são estabelecidas por outras agências reguladoras ¹⁴²⁻¹⁴⁴. A Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM, do inglês *American Society for Testing and Materials*) e o Comitê Europeu de Normalização (ECS, do inglês *European Committee for Standardization*), por exemplo, são os órgãos mais importantes.

Independentemente da norma em vigor, nacional ou internacional, poucas espécies químicas são monitoradas na matriz etanólica. No entanto, se não controlados, os combustíveis de origem biológica podem conter contaminantes danosos ao motor automotivo e ao meio ambiente ^{131,145}.

O controle de qualidade em diferentes países também deve ser executado de forma semelhante e o combustível adequado à sua finalidade, ou seja, é importante manter as suas propriedades em toda a cadeia de abastecimento, desde o produtor até chegar ao consumidor final ^{123,125}.

Um sumário comparativo entre as normas brasileiras e estrangeiras para o controle de qualidade do etanol combustível em relação à composição química inorgânica é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Normas oficiais para o controle de contaminantes químicos inorgânicos em etanol combustível.

Analito	Técnica	Norma	LMP	Referência
Cloreto	CLTI-DC	ABNT NBR 10894	1 mg kg ⁻¹	122,135
	Potenciometria	ABNT NBR 10895 *		122,146
	CLTI-DC	ASTM D7319	1 mg kg ⁻¹	143,147
	CLTI-DC	ASTM D7319	32 mg L ⁻¹	142,147
	CLTI-DC	EN 15492	20 mg L ⁻¹	144,148
	Potenciometria	EN 15484		144,149
Sulfato	CLTI-DC	ABNT NBR 10894	4 mg kg ⁻¹	122,135
	Volumetria	ABNT NBR 12120 *		122,150
	CLTI-DC	ASTM D7319	4 mg kg ⁻¹	142,147
	CLTI-DC	EN 15492	4 mg kg ⁻¹	144,148
Sódio	FC	ABNT NBR 10422	2 mg kg ⁻¹	122,151
Ferro	EAAC	ABNT NBR 11331	5 mg kg ⁻¹	122,132
Cobre	EAAC	ABNT NBR 10893 **	0,07 mg kg ⁻¹	122,132,152
	EAAC	ASTM D1688	0,1 mg kg ⁻¹	142,153
	EAAC	ASTM D1688	1 mg L ⁻¹	143,153
	EAAFG	EN 15488	0,1 mg kg ⁻¹	144,154

* Normas canceladas em 23/07/2007

** Norma ABNT NBR 10893:1990 cancelada em 27/08/2007 e substituída pela norma ABNT NBR 11331:2007

LMP: limite máximo permitido; **CLTI-DC:** cromatografia líquida por troca iônica com detecção condutimétrica; **EAAC:** espectrometria de absorção atômica com chama; **EAAFG:** espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; **FC:** fotometria de chama.

O íon cloreto propicia o processo de corrosão, podendo danificar certos componentes metálicos que compõem a estrutura do motor automotivo e dos tanques reservatórios ¹³¹. A norma norte-americana ¹⁴² estabelece um limite máximo de cloreto inorgânico de 32 mg L⁻¹, enquanto as normas brasileira ¹²² e europeia ¹⁴⁴ estabelecem limites máximos de 1 mg kg⁻¹ e 20 mg L⁻¹,

respectivamente, para o mesmo íon. Devido aos possíveis impactos, fabricantes de veículos e equipamentos, geralmente, sugerem um limite baixo para este parâmetro.

Tanto a norma brasileira quanto as internacionais estabelecem um limite máximo de 4 mg de sulfato por kg de etanol combustível^{122,142,144}. Sais de sulfato também propiciam a corrosão e podem se depositar nos dispositivos de mediação e causar entupimentos nos filtros da bomba de distribuição do combustível, além de poderem obstruir o injetor de combustível, resultando em falhas no motor e baixa dirigibilidade^{127,131}.

Somente a norma brasileira estabelece um limite para a concentração de ferro em etanol combustível. Depósitos deste metal podem ser formados durante a etapa de explosão do combustível. Embora seja necessária apenas a determinação do conteúdo total de ferro, é possível que este elemento esteja presente em diferentes espécies (por exemplo, Fe^{2+} e Fe^{3+}), em função do pH, do grau de corrosão dos equipamentos de destilação e dos tanques reservatórios, do tempo de armazenagem do combustível, etc. Portanto, a especiação de ferro pode ser útil para avaliar esses fatores.

Até o presente, apenas um trabalho foi encontrado na literatura descrevendo a determinação do íon nitrato em etanol combustível¹³⁰. Por outro lado, nenhum método foi encontrado para a determinação do íon acetato. Algumas metodologias alternativas foram publicadas para a determinação dos íons cloreto e sulfato usando diferentes técnicas analíticas. A Tabela 3 ilustra um resumo desses métodos com seus respectivos limites de detecção.

Tabela 3. Métodos analíticos alternativos para a determinação de contaminantes aniônicos em etanol combustível.

Analito	Técnica	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Nitrato	EC-DCC	80	130
Cloreto	AIF-DA	13	129
	EC-DAD	16	155
	EC-DAD	41	156
	EC-DCC	60	130
	FRXED	25	157
	VRC	40	158
Sulfato	AIS-EAM	270	126
	EC-DAD	27	155
	EC-DAD	33	156
	EC-DCC	80	130
	FRXED	30	157

LD: limite de detecção; **AIF-DA:** análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica; **AIS-EAM:** análise por injeção sequencial com detecção por espectrofotometria de absorção molecular; **EC-DAD:** eletroforese capilar com detecção por arranjo de diodos; **EC-DCC:** eletroforese capilar com detecção condutimétrica sem contato; **FRXED:** fluorescência de raios X por energia dispersiva; **VRC:** voltametria de redissolução catódica.

Diversos métodos analíticos alternativos são descritos na literatura para a determinação de íons cobre e ferro, assim como outros contaminantes metálicos não especificados nas normas em vigor, em etanol combustível. Porém, nenhum trabalho foi encontrado relatando a especiação de ferro neste tipo de matriz. Os métodos publicados foram desenvolvidos, sobretudo, por pesquisadores brasileiros e são, em geral, baseados em técnicas espectroscópicas ou eletroquímicas. Uma lista de vários destes trabalhos, descrevendo os limites de detecção de cada metodologia, é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Métodos analíticos alternativos para a determinação de contaminantes metálicos em etanol combustível.

Analito	Técnica	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Cádmio	EAAC	0,2	159
	EAAFG	0,05	160
	EAAFG	0,1	161
	EM-PAI-NU	0,12	162
	EM-PAI-VE	0,08	163
	VOQ/VPD/VVL	1,1-2,9	124
Chumbo	EAAFG	0,3	161
	EAAFG	0,6	164
	EAAFG	1,1	160
	EM-PAI-NU	0,2	162
	EM-PAI-VE	0,05	163
	VOQ/VPD/VVL	3-7,9	124
	VRAAnOQ	0,24	133
Cobalto	EAAC	1,4	159
	EM-PAI-NU	0,04	162
Cobre	EAAC	0,8	165
	EAAC	1,4	159
	EAAC	1,7	166
	EAAC	2,3	167
	EAAFG	0,22	168
	EAAFG	0,57	169
	EAAFG	0,6	164
	EM-PAI-NU	0,4	162
	EM-PAI-VE	0,1	163
	EAM	8-77	111
	VOQ/VPD/VVL	0,5-1,5	124
VRAAnOQ	0,12	133	

	VRA _n PD	2	170
	VRA _n VL	1,4	171
Ferro	EAAC	2,7	165
	EAAC	5	167
	EAAC	40	172
	EAAFG	1,3	169
	EAAFG	1,6	168
	EAAFG	1,8	164
	EM-PAI-NU	27	162
	EAM	5-11	111
Manganês	EAAFG	0,2	168
	EAAFG	0,4	169
	EM-PAI-NU	0,7	162
Níquel	EAAC	2,3	166
	EAAC	2,3	165
	EAAC	7,8	167
	EAAFG	0,4	164
	EAAFG	1,1	168
	EAAFG	1,3	169
	EM-PAI-NU	0,4	162
	VRA _d PD	3	173
Zinco	EAAC	0,1	167
	EAAC	0,34	166
	EAAC	1	159
	EAAC	3,8	165
	VOQ/VPD/VVL	0,5-1,7	124
	VRA _n VL	17	174

LD: limite de detecção; **EAAC**: espectrometria de absorção atômica com chama; **EAAFG**: espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; **EAM**: espectrofotometria de absorção molecular; **EM-PAI-NU**: espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e nebulização ultrassônica; **EM-PAI-VE**: espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente e vaporização eletrotérmica; **VOQ**: voltametria de onda quadrada; **VPD**: voltametria de pulso diferencial; **VVL**: voltametria de varredura linear; **VRA_dPD**: voltametria de redissolução adsorptiva de pulso diferencial; **VRA_nOQ**: voltametria de redissolução anódica de onda quadrada; **VRA_nPD**: voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial; **VRA_nVL**: voltametria de redissolução anódica de varredura linear.

Os baixos níveis de detectabilidade obtidos através dos métodos espectroscópicos para a determinação de elementos metálicos em bioetanol se devem, em geral, a etapa de pré-concentração, que aumenta a quantidade relativa do soluto na amostra.

Todavia, embora os métodos espectroscópicos estabelecidos nas normas sejam amplamente utilizados e confiáveis, uma vez que nem sempre é possível a obtenção de material e equipamentos para a implementação de análises de rotina sob determinadas condições ou a viabilidade não é favorável, do ponto de vista analítico e/ou econômico, é importante que métodos alternativos sejam desenvolvidos para a determinação sequencial de substâncias potencialmente contaminantes em amostras de etanol combustível.

Portanto, este trabalho descreve o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a determinação de contaminantes aniônicos (acetato e nitrato) e íons metálicos (ferro(II), ferro(III) e cobre) em bioetanol, com injeção direta de amostra, através do emprego das técnicas de CLTI e CLQI com detecção condutimétrica e fotométrica, respectivamente.

CAPÍTULO II

Objetivos

II.1 GERAL

O presente trabalho focou no desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a determinação de compostos aniônicos (nitrato e acetato) e íons metálicos (ferro(II), ferro(III) e cobre) em amostras de etanol combustível, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, empregando as técnicas de CLTI e CLQI com detecção condutimétrica e fotométrica, respectivamente.

II.2 ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral supracitado, foi necessário estabelecer e seguir os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Planejar as estratégias analíticas adotadas para o desenvolvimento dos métodos;
- ❖ Realizar testes analíticos com diferentes colunas cromatográficas e eluentes;
- ❖ Avaliar a influência de diversos fatores sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse;
- ❖ Demonstrar a eficácia para separar completamente os sinais dos constituintes de interesse dos outros componentes presentes na amostra;
- ❖ Determinar os principais parâmetros analíticos para os métodos propostos, de modo que os futuros usuários tenham um conhecimento suficiente a ponto de discernir quando o método terá ou não um desempenho aceitável.

CAPÍTULO III

Material e Métodos

III.1 TRABALHOS PRELIMINARES

Esta etapa do trabalho consistiu na análise da bibliografia básica sobre procedimentos e métodos em laboratório; na organização do laboratório (equipamentos, vidrarias, aquisição de reagentes, preparo de soluções, etc.) e no treinamento em manipulações e técnicas.

III.2 INFRAESTRUTURA

Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados em laboratórios de diferentes instituições, listados a seguir, os quais dispunham de toda a infraestrutura necessária para a realização dos estudos propostos.

- (1) Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS), localizado no Instituto de Química da UNICAMP, sob supervisão do Professor Dr. Lauro T. Kubota.
- (2) Centro Australiano de Pesquisa em Ciência da Separação (ACROSS), sediado nas dependências da Escola de Química da Universidade da Tasmânia, sob supervisão dos Professores Dr. Pavel N. Nesterenko e Dr. Paul R. Haddad, durante o período de estágio sanduíche.

III.2.1 EQUIPAMENTOS

Os experimentos relacionados à determinação de compostos aniônicos foram efetuados em um cromatógrafo de íons modular da fabricante Metrohm AG (Herisau, Suíça).

O cromatógrafo possui os seguintes módulos: bomba cromatográfica 818, centro de separação 820, bomba peristáltica 833, detector condutimétrico 819 com supressor de condutividade (MSM) e interface 830.

Para a determinação dos íons metálicos, os ensaios foram realizados em um cromatógrafo de íons compacto do mesmo fabricante, modelo 844, com reator pós-coluna e sistema de detecção fotométrica.

O software usado para aquisição e tratamento de dados foi o Metrodata IC Net, versão 2.3.

III.2.2 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Diversas colunas cromatográficas foram utilizadas neste trabalho, sendo procedentes de diferentes fabricantes, conforme discriminado a seguir.

A pressão no sistema cromatográfico foi monitorada ao longo de todo o trabalho no cromatógrafo de íons de forma a se preservar a coluna e identificar possíveis necessidades de manutenção.

III.2.2.1 Ânions

As colunas cromatográficas de troca aniônica que foram testadas neste estudo foram as seguintes (Metrohm AG): Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.) e Metrosep A Supp 10 (100 x 4,0 mm D.I.), ambas à base de substrato polimérico funcionalizado com grupamentos quaternários de amônio. Suas principais características são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Características gerais das colunas cromatográficas utilizadas para a determinação de ânions.

Propriedade	Coluna Metrosep	
	<i>A Supp 5</i>	<i>A Supp 10</i>
Corpo da coluna	PEEK	PEEK
Dimensão (mm)	150 x 4,0	100 x 4,0
Faixa de pH	3-12	0-14
Pressão máxima (MPa)	15	20
Vazão máxima (mL min ⁻¹)	0,8	2
Capacidade de troca (μmol Cl ⁻)	70	85
Diâmetro das partículas (μm)	5	4,6
Matriz	PVA	PS-DVB
Grupo funcional	NR ₄ ⁺	NR ₄ ⁺

III.2.2.2 Cátions

Para a separação dos íons metálicos uma coluna cromatográfica à base de sílica do tipo Kromasil, funcionalizada com o grupamento ácido iminodiacético (AIDA), foi utilizada em todos os ensaios. Nas condições otimizadas, mais duas colunas foram testadas, ambas à base de sílica do tipo Nucleosil, funcionalizada com o mesmo grupamento ácido, e disponíveis comercialmente pela companhia JPP Chromatography Ltd. (Brentor, Reino Unido). Suas principais características são listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Características gerais das colunas cromatográficas utilizadas para a determinação de íons metálicos.

Propriedade	Coluna JPP		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Corpo da coluna	PEEK	PEEK	PEEK
Dimensão (mm)	150 x 4,0	150 x 4,0	100 x 4,0
Faixa de pH	1-6	1-6	1-6
Diâmetro das partículas (μm)	5	5	5
Matriz	Sílica Kromasil	Sílica Nucleosil	Sílica Nucleosil
Grupo funcional	AIDA	AIDA	AIDA

III.2.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

Reagentes de alta pureza (Merck e Sigma-Aldrich) e água desionizada (Sistema de filtração Milli-Q) foram usados em todos os experimentos, conforme discriminado a seguir para cada classe de íons.

As soluções padrão e as amostras foram passadas por filtros de seringa do tipo Millex, com membranas à base de PTFE de 0,22 μm de porosidade, antes de serem injetadas no sistema cromatográfico.

III.2.3.1 Ânions

Diversas misturas de carbonato e bicarbonato de sódio, listadas na Tabela 7, foram usadas nos sistemas de eluição checados inicialmente em função da coluna cromatográfica testada.

Tabela 7. Sistemas de eluição utilizados durante a etapa inicial de otimização da separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato de acordo com a coluna utilizada. Condições fixadas: eluição isocrática a $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ na coluna Metrosep A Supp 5, mantida à temperatura ambiente ($27\text{-}30^\circ\text{C}$), e eluição isocrática a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ na coluna Metrosep A Supp 10, mantida a 45°C .

Coluna cromatográfica	$\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$ (mmol L^{-1})	Força iônica (<i>I</i>)
Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.)	1,6 + 0,5	0,0053
	3,2 + 1	0,0106
	6,4 + 2	0,0212
Metrosep A Supp 10 (100 x 4,0 mm D.I.)	2,5 + 2,5	0,01
	5 + 5	0,02
	10 + 10	0,04

Uma solução de ácido sulfúrico a 50 mmol L^{-1} foi empregada como regenerante da resina de troca catiônica do sistema de supressão química de condutividade.

Diferentes soluções padrão estoque a 1000 mg L^{-1} foram preparadas em meio aquoso para cada ânion a partir de seus sais de sódio. Os ensaios foram efetuados com soluções padrão de trabalho uni- e multicomponentes preparadas em água Milli-Q e etanol puro.

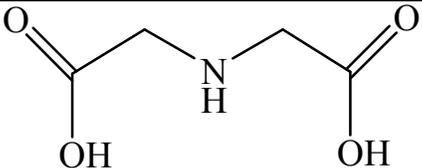
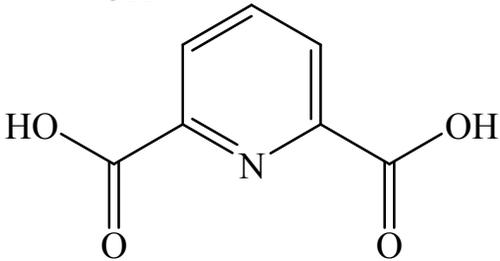
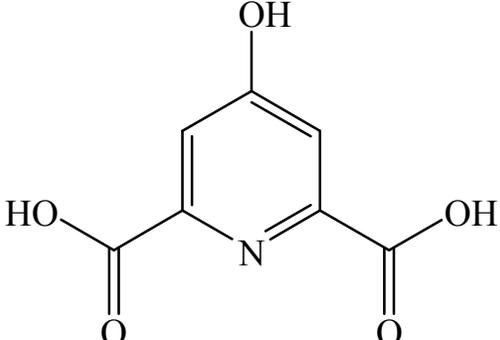
III.2.3.2 Cátions

Os ácidos piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico, ADPC) e 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxílico (ácido quelidâmico, AQLD) foram selecionados como agentes quelantes para a separação cromatográfica dos íons metálicos. Outros reagentes também foram usados nos sistemas de eluição de cátions, entre eles, a trietanolamina (TEA), o ácido clorídrico (HCl) e o metanol (MeOH).

Uma solução aquosa de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) a $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ em 1 mol L^{-1} de amônia foi usada como reagente cromóforo pós-coluna (RPC) em todos os experimentos envolvendo a detecção fotométrica de íons metálicos a 510 nm ¹⁶.

As fórmulas estruturais dos agentes quelantes constituintes das fases móvel e estacionária, bem como suas constantes de dissociação, são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Fórmulas estruturais dos agentes quelantes constituintes das fases estacionária e móvel, empregados na separação cromatográfica dos íons metálicos, com os respectivos logaritmos de suas constantes de dissociação ^{175,176}.

Agente quelante	Estrutura química	pK_a-1	pK_a-2
AIDA (fase estacionária)		2,98	9,89
ADPC (fase móvel)		2,16	4,76
AQLD (fase móvel)		< 2	3,47

Uma solução estoque aquosa de ADPC a 20 mmol L^{-1} foi utilizada para a preparação dos sistemas de eluição do primeiro método e uma solução estoque aquosa mista de AQLD e TEA a 10 e 15 mmol L^{-1} , respectivamente, foi utilizada para a preparação dos sistemas de eluição do segundo método.

A escolha do modificador orgânico da fase móvel se deu com base nos dados de viscosidades de misturas de solventes em função da composição¹⁷⁷, de acordo com a Figura 1. Neste sentido, a fim de preservar a coluna e o sistema cromatográfico, o solvente escolhido precisava apresentar uma viscosidade compatível com a pressão suportada pelo sistema. Além disso, o custo e a função orgânica do solvente, entre outros fatores, também foram considerados. Desta forma, o solvente selecionado foi o metanol (MeOH).

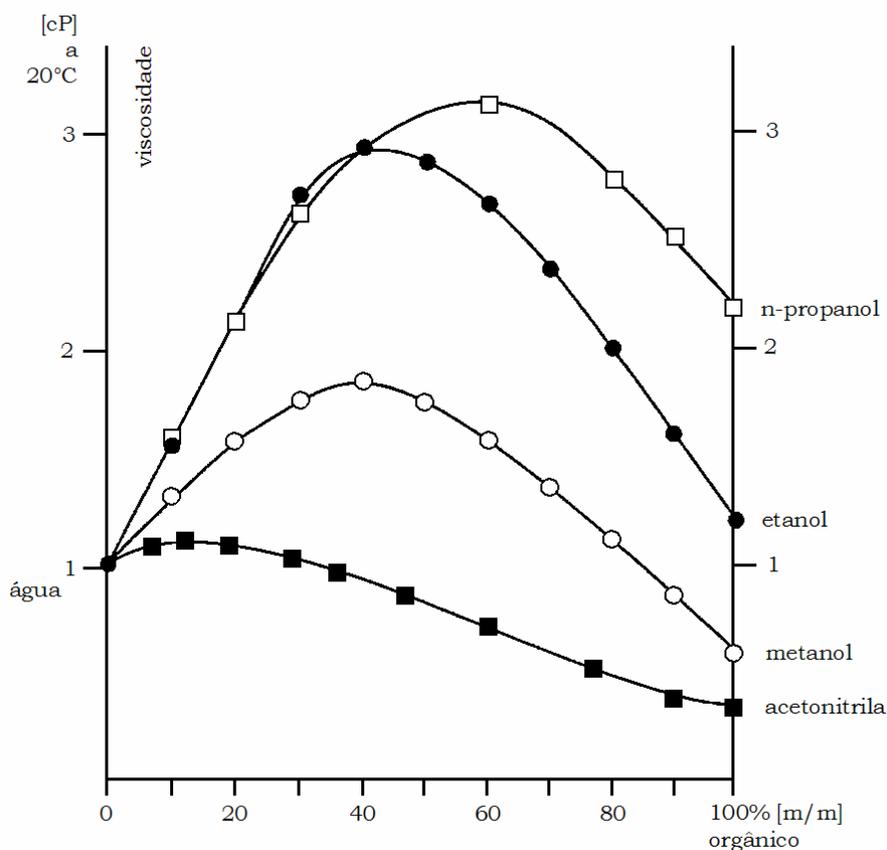


Figura 1. Viscosidades de misturas de solventes em função da composição ¹⁷⁷.

Diferentes soluções padrão estoque em meio ácido a 1000 mg L^{-1} foram usadas para cada íon metálico. O efeito do contra íon do reagente usado como padrão também foi avaliado. Assim, para os íons Fe(II) e Cu foram utilizados os sais de sulfato em meio sulfúrico, enquanto para os demais metais avaliados (Cd, Co, Fe(III), Mn, Ni, Pb e Zn) foram utilizados os sais de nitrato em meio nítrico. Os ensaios foram efetuados com soluções padrão de trabalho uni e multielementares preparadas em etanol puro.

A Tabela 9 apresenta as constantes de estabilidade (β_1 e β_2), em escala logarítmica, dos complexos formados entre os ácidos iminodiacético, dipicolínico e quelidâmico e os diversos metais avaliados. Os índices 1 e 2 em β dizem respeito às razões 1:1 e 1:2 (metal:ligante), respectivamente.

Tabela 9. Constantes de estabilidade de complexos de íons metálicos com os ácidos iminodiacético (AIDA), dipicolínico (ADPC) e quelidâmico (AQLD) em soluções aquosas¹⁷⁸⁻¹⁸².

Íon metálico	IDA		ADPC		AQLD	
	$\log\beta_1$	$\log\beta_2$	$\log\beta_1$	$\log\beta_2$	$\log\beta_1$	$\log\beta_2$
Mn(II)	-	-	5,01	8,49	6,7	-
Cd(II)	5,73	10,19	6,75	11,15	-	-
Fe(II)	5,80	10,10	5,71	10,36	-	-
Co(II)	6,97	12,31	6,65	12,70	8,4	16,2
Zn(II)	7,27	12,60	6,35	11,88	9,3	17,8
Pb(II)	7,45	-	8,70	11,60	-	-
Ni(II)	8,19	14,30	6,95	13,50	9,2	17,3
Cu(II)	10,63	16,68	9,14	16,52	12,2	22,1
Fe(III)	10,72	-	10,91	17,13	-	-

III.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

III.3.1 OTIMIZAÇÃO

Inicialmente, inúmeras colunas cromatográficas de diferentes fabricantes e variadas composições (A Supp 5, A Supp 10, C2, C3, Nucleosil 5SA, SeQuant ZIC, PolyCat A, IonPac CG5, AIDA-Kromasil e AIDA-Nucleosil) foram testadas com uma grande diversidade de reagentes eluentes (carbonato e bicarbonato de sódio, ácidos nítrico, clorídrico, sulfúrico, metanossulfônico, ascórbico, cítrico, oxálico, tartárico, hidroxibenzóico, ftálico, dipicolínico e quelidâmico, perclorato

de magnésio, sulfato de lítio, acetato de amônio, histidina, etc.) com e sem modificadores orgânicos (acetonitrila ou metanol), envolvendo mecanismos de separação diversos, tais como, troca iônica simples, troca zwitteriônica e quelação de íons, usando detecção condutimétrica ou fotométrica, na tentativa de separar as duas classes de íons (ânions e cátions) individualmente ou conjuntamente. Todavia, o desempenho da maior parte dos sistemas avaliados foi insatisfatório nas condições investigadas.

Neste sentido, a separação cromatográfica de ânions e cátions foi efetuada de forma diferenciada, sendo utilizada a técnica de CLTI com detecção condutimétrica para os ânions e a técnica de CLQI com detecção fotométrica para os cátions. Os métodos de otimização empregados também foram diferentes, sendo aplicado o procedimento de otimização multivariada para os ânions e univariada para os cátions.

De maneira geral, os parâmetros cromatográficos avaliados foram os seguintes: tempo e fator de retenção, número de pratos, fator de assimetria e resolução.

O fator de retenção (k), que representa a relação entre o tempo em que o soluto é retido pela fase estacionária e o tempo em que o mesmo é eluído pela fase móvel, foi calculado de acordo com a Equação (1) ¹⁶:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Onde,

t_R representa o tempo de retenção do composto, expresso em minutos;

t_M representa o tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária, expresso em minutos.

A eficiência da separação cromatográfica, que representa o poder de separação com dispersão mínima do composto, foi avaliada através do número de pratos (N), calculado de acordo com a Equação (2) ¹⁶:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_t} \right)^2 \quad (2)$$

Onde,

t_R representa o tempo de retenção do pico, expresso em minutos;

w_t representa a largura da base entre as tangentes do pico, expressa em minutos.

A qualidade dos picos cromatográficos foi avaliada através do fator de assimetria (A), cuja unidade representa o valor de referência. Seu cálculo é efetuado a 1/10 da altura do pico, de acordo com a Equação (3) ¹⁶:

$$A = \frac{w_2}{w_1} \quad (3)$$

Onde,

w_2 representa a largura após o topo do pico;

w_1 representa a largura antes do topo do pico.

Em função do perfil apresentado para cada cromatograma obtido, a resolução (R) foi usada para avaliar a qualidade da separação, sendo calculada de acordo com a Equação (4) ¹⁶:

$$R = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{t_1} + w_{t_2}} \quad (4)$$

Onde,

t_{R_1} e t_{R_2} representam os tempos de retenção para o primeiro e o segundo pico, respectivamente;

w_{t_1} e w_{t_2} representam a largura da base entre as tangentes para o primeiro e o segundo pico, respectivamente, na mesma unidade de tempo de t_{R_1} e t_{R_2} .

O efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica dos íons metálicos foi avaliado através da curva de van Deemter, construída com base na Equação (5) ¹⁷:

$$H = \frac{L}{N} = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (5)$$

Onde,

H representa a altura de prato, expressa em mm;

L representa o comprimento da coluna cromatográfica, expresso em cm ou mm;

N representa o número de pratos;

A representa o termo relacionado aos caminhos múltiplos do soluto;

B representa o termo relacionado à difusão longitudinal do soluto;

C representa o termo de resistência de transferência de massa;

μ representa a velocidade linear da fase móvel, expressa em cm s^{-1} , sendo igual ao

quociente $\frac{L}{t_M}$.

III.3.1.1 Ânions

Os ânions selecionados foram separados pela técnica de cromatografia líquida por troca iônica com detecção condutimétrica (CLTI-DC) após supressão química.

Inicialmente, diversos ensaios foram realizados com o intuito de selecionar a coluna cromatográfica e o sistema de eluição que fornecessem as melhores condições de separação em um menor tempo de análise. Após esta etapa, empregou-se um procedimento de otimização multivariada através de um planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central, a fim de investigar como a eficiência da separação cromatográfica, avaliada por meio do número de pratos (N), e a retenção de cada composto, avaliada por meio do fator de retenção (k), são afetadas pela presença de um modificador orgânico (acetonitrila) no eluente, pela temperatura da coluna, pela vazão da fase móvel e pelo volume de injeção. Os fatores estudados e seus respectivos níveis são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Fatores estudados e seus respectivos níveis para o planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central.

Fator	Nível		
	-1	0	1
1: Teor de acetonitrila (%)	0	5	10
2: Temperatura da coluna (°C)	35	40	45
3: Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	0,7	0,75	0,8
4: Volume de injeção (µL)	10	15	20

III.3.1.2 Cátions

A técnica analítica que apresentou os melhores resultados para a separação dos íons metálicos foi a cromatografia líquida por quelação de íons com detecção fotométrica (CLQI-DF) na região visível após a etapa de reação pós-coluna.

De maneira geral, esta etapa do trabalho envolveu o estudo univariado de diversos fatores, tais como, a concentração e o tipo de agente quelante utilizado, a acidez do meio, a concentração e o tipo de modificador orgânico, a temperatura da coluna, a vazão da fase móvel, entre outros fatores, considerando os solutos individualmente e simultaneamente, a fim de estabelecer as melhores condições de separação em um menor tempo de análise.

Os principais parâmetros envolvidos no processo de detecção fotométrica foram fixados, embora tenham sido variados ocasionalmente, conforme especificado a seguir:

- ◇ RPC: 0,15 mmol L⁻¹ PAR + 1 mol L⁻¹ NH₃;
- ◇ Comprimento de onda de detecção: 510 e 715 nm;
- ◇ Volume da bobina (*coil*) de reação: 490 µL (250 x 0,05 cm D.I., PTFE);
- ◇ Vazão do RPC *: 0,36 e 0,82 mL min⁻¹ para os tubos de bomba peristáltica de 0,51 (laranja-amarelo) e 0,76 (preto-preto) mm D.I., respectivamente, ambos de PVC;
- ◇ Volume de injeção: 20 e 100 µL.

* Vazão do RPC = vazão total do sistema – vazão da fase móvel. A vazão total do sistema foi obtida experimentalmente por meio da medida do tempo necessário para preencher um balão volumétrico de 5 mL com o efluente coletado na saída do detector fotométrico.

III.3.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS

Após a etapa de otimização das condições cromatográficas para os ânions e cátions selecionados, foram efetuados diversos ensaios visando estabelecer os principais parâmetros de validação para as diferentes metodologias desenvolvidas.

Para isso, curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados dos ensaios (área de pico) em função da concentração do analito para a determinação da sensibilidade e da faixa linear.

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, sendo dependente de sua natureza e da técnica de detecção utilizada^{183,184}. Sua determinação foi efetuada simultaneamente aos ensaios de linearidade e seu valor expresso pelo coeficiente angular da curva analítica correspondente à faixa linear de cada analito.

A precisão serve para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade são as três formas mais comuns de expressá-la, usualmente pela estimativa do desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR)^{183,184}. Neste trabalho, a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade através da realização de ensaios em triplicata de soluções padrão e amostras selecionadas, sendo seus valores expressos em termos de DPR.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação. Para isso, as amostras foram adicionadas com o analito em três diferentes concentrações, assim sendo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Desta forma, seu cálculo foi efetuado de acordo com a Equação (6)¹⁸³:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} 100 \quad (6)$$

Onde,

C_1 representa a concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 representa a concentração determinada na amostra não adicionada;

C_3 representa a concentração adicionada.

A detectabilidade analítica dos métodos desenvolvidos foi determinada com base nas razões sinal-ruído de 3:1 e 10:1 para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), respectivamente¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

Para demonstrar a aplicabilidade das metodologias desenvolvidas foram utilizadas aproximadamente 20 amostras de etanol combustível comercial (AEHC), procedentes de diferentes postos de abastecimento de combustíveis da região metropolitana de Campinas (SP), fornecidas pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

A quantificação dos íons de interesse nas amostras analisadas foi obtida através do método de padronização externa, que consiste, resumidamente, na comparação da área de pico de cada analito com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

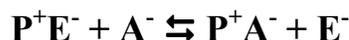
CAPÍTULO IV

Resultados e Discussão

Íons Acetato e Nitrato

IV.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Os ensaios para a otimização da separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato foram efetuados com colunas cromatográficas à base de matriz polimérica funcionalizada com grupamentos quaternários de amônio e eluentes contendo misturas de carbonato e bicarbonato de sódio e, posteriormente, acetonitrila. O mecanismo de separação envolveu, basicamente, equilíbrios de troca iônica através de interações eletrostáticas, de acordo com a seguinte equação química ¹⁶:



Onde,

P^+ representa a matriz polimérica funcionalizada com o grupo trocador (NR_4^+);

E^- representa o ânion do eluente (CO_3^{2-} e HCO_3^-);

A^- representa o ânion da amostra;

P^+E^- representa a interação da fase estacionária com o eluente;

P^+A^- representa a retenção interação da fase estacionária com a amostra.

Inicialmente, certas condições cromatográficas foram fixadas para cada fase estacionária testada, conforme as recomendações do fabricante, e variados os sistemas de eluição, de acordo com a Tabela 7, a fim de estabelecer qual proporcionaria a melhor separação em um tempo de análise adequado.

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram como o fator de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, de cada ânion selecionado variam em função da força iônica da fase móvel quando se empregam as colunas Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.) e Metrosep A Supp 10 (100 x 4,0 mm D.I.).

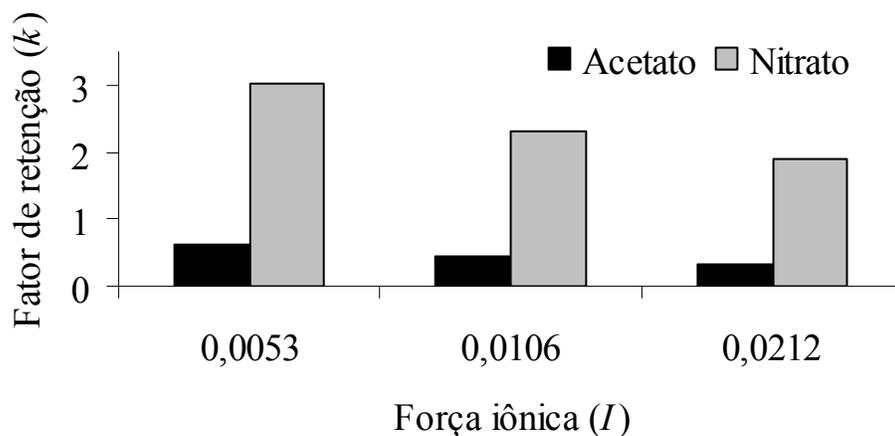
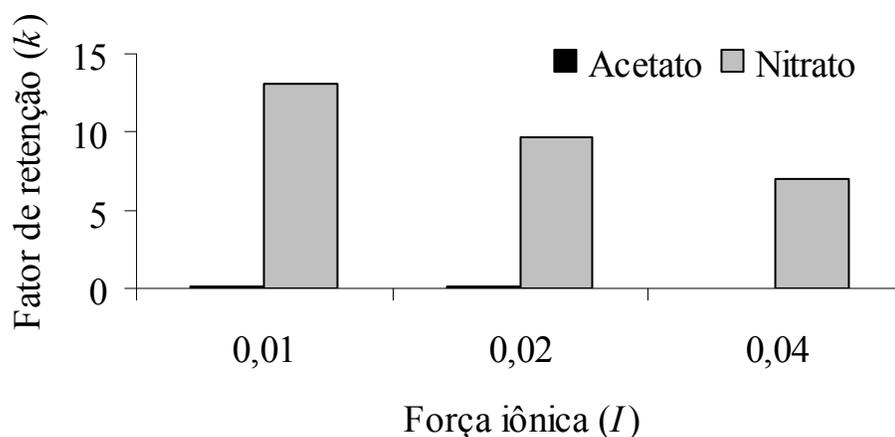
(a) *A Supp 5.*(b) *A Supp 10.*

Figura 2. Variação no fator de retenção de cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. (a) Coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (27-30°C) – eluição isocrática a 0,7 mL min⁻¹. (b) Coluna Metrosep A Supp 10 (100 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C – eluição isocrática a 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Soluções padrão multicomponentes preparadas com o próprio eluente contendo 10 mg L⁻¹ de cada composto.

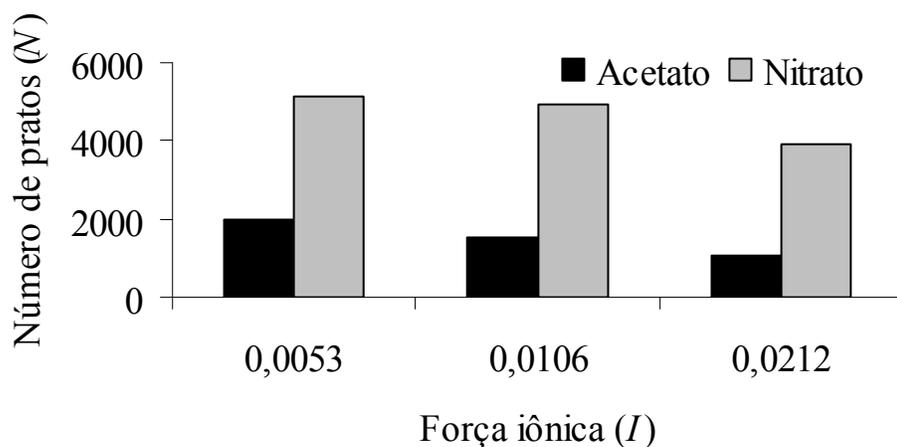
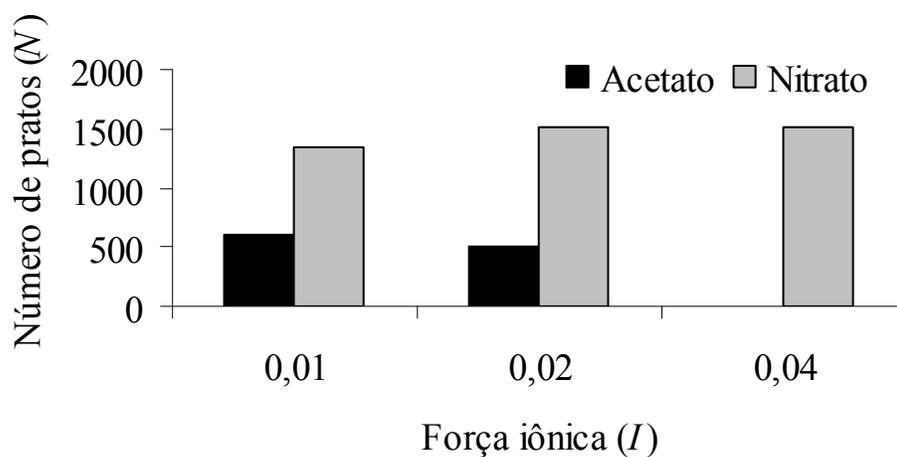
(a) *A Supp 5.*(b) *A Supp 10.*

Figura 3. Variação no número de pratos para cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 2.

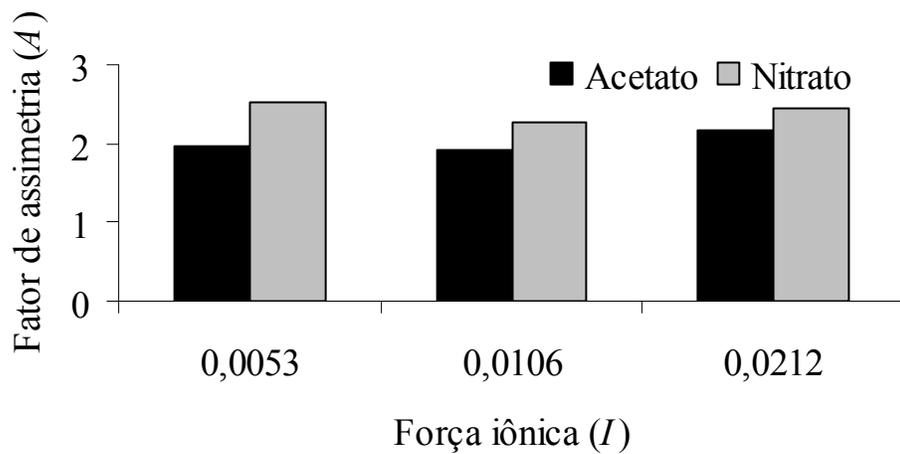
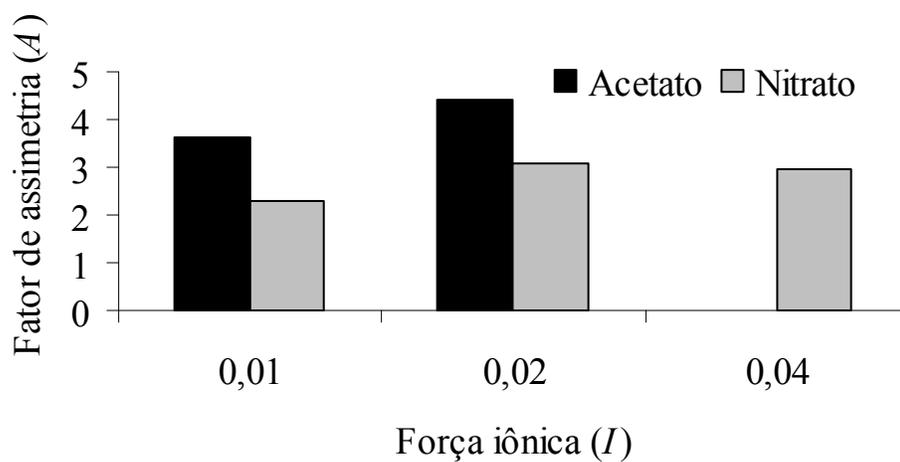
(a) *A Supp 5.*(b) *A Supp 10.*

Figura 4. Variação no fator de assimetria de cada composto em função da composição da fase móvel e da coluna cromatográfica utilizada. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 2.

A coluna A Supp 10 se mostrou inadequada para os ensaios executados devido à fraca retenção do íon acetato, bem como sua menor eficiência e maior assimetria dos picos. Desta forma, considerando a coluna A Supp 5 sendo a mais apropriada, avaliou-se qual sistema de eluição proporcionou as melhores condições de separação em relação aos diversos parâmetros cromatográficos avaliados.

De acordo com a análise dos parâmetros cromatográficos apresentados nos gráficos anteriores para a coluna A Supp 5, como era de se esperar a menor força iônica produziu a maior retenção dos analitos na fase estacionária e, conseqüentemente, uma melhor eficiência cromatográfica. Por outro lado, o perfil dos picos, avaliado através do fator de assimetria, se mostrou mais adequado com o emprego da força iônica intermediária. Para ilustrar essa interpretação, a Figura 5 apresenta a sobreposição dos cromatogramas referentes aos ensaios realizados.

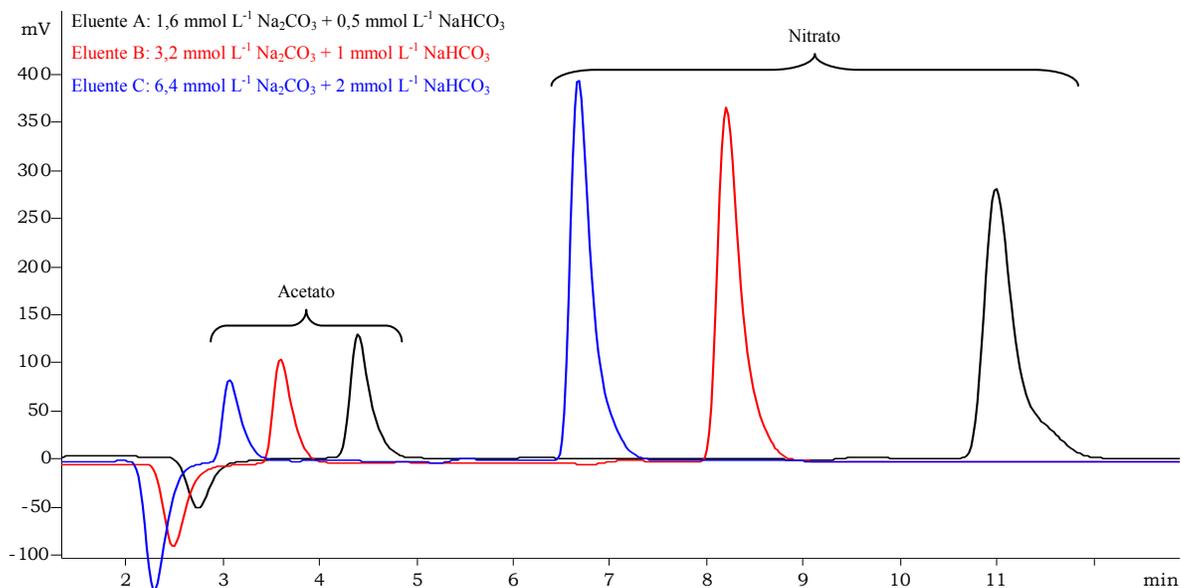


Figura 5. Cromatogramas sobrepostos ilustrando a comparação dos três sistemas de eluição avaliados com a coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (27-30°C). Eluição isocrática a 0,7 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Soluções padrão multicomponentes preparadas com o próprio eluente contendo 10 mg L⁻¹ de cada analito.

Portanto, embora o emprego da força iônica mais baixa tenha proporcionado os melhores resultados para a eficiência da separação, optou-se pelo emprego da força iônica intermediária (eluente B) a fim de reduzir o tempo total de análise, considerando que nestas condições também foram obtidos resultados satisfatórios com picos cromatográficos mais simétricos.

Após estabelecer as fases móvel e estacionária para os ensaios subsequentes, um planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central (PC) foi efetuado a fim de investigar como a eficiência cromatográfica e a retenção de cada composto seriam afetadas pela presença de um modificador orgânico (acetonitrila) no eluente, pela temperatura da coluna, pela vazão da fase móvel e pelo volume de injeção. A Tabela 10 apresenta os fatores estudados e seus respectivos níveis.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória, sendo efetuados 20 ensaios no total, incluindo 4 réplicas no ponto central (ensaios 17, 18, 19 e 20). A matriz de planejamento utilizada e os resultados obtidos para o fator de retenção (k) e para o número de pratos (N) são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Matriz utilizada e resultados obtidos para o planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Experimentos realizados em ordem aleatória.

Ensaio	Fator				Resposta			
	1	2	3	4	<i>k</i>		<i>N</i>	
					Acetato	Nitrato	Acetato	Nitrato
1	0	35	0,7	10	0,46	2,30	1772	4681
2	10	35	0,7	10	0,45	1,94	1917	6023
3	0	45	0,7	10	0,46	2,16	1845	6056
4	10	45	0,7	10	0,45	1,83	1961	6169
5	0	35	0,8	10	0,46	2,30	1693	5455
6	10	35	0,8	10	0,45	1,94	1770	5753
7	0	45	0,8	10	0,46	2,15	1633	5546
8	10	45	0,8	10	0,46	1,84	1831	5754
9	0	35	0,7	20	0,45	2,26	1914	6813
10	10	35	0,7	20	0,44	1,92	2054	6484
11	0	45	0,7	20	0,45	2,10	1955	6567
12	10	45	0,7	20	0,45	1,83	2238	6974
13	0	35	0,8	20	0,45	2,27	1670	6088
14	10	35	0,8	20	0,45	1,93	2016	6331
15	0	45	0,8	20	0,45	2,11	1767	6079
16	10	45	0,8	20	0,45	1,84	2071	6522
17 (PC)	5	40	0,75	15	0,46	2,04	1879	6456
18 (PC)	5	40	0,75	15	0,46	2,06	1892	6453
19 (PC)	5	40	0,75	15	0,46	2,05	1885	6498
20 (PC)	5	40	0,75	15	0,46	2,05	1887	6517

Fator 1: teor de acetonitrila (%); Fator 2: temperatura da coluna (°C); Fator 3: vazão da fase móvel (mL min⁻¹); Fator 4: volume de injeção (µL); PC: ponto central; *k*: fator de retenção; *N*: número de pratos.

Com base nos dados de resposta (*k* e *N*) para as duas espécies químicas, foram calculados os efeitos principais e os efeitos de interação de dois, três e quatro fatores e seus respectivos erros. Os cálculos foram feitos usando planilhas eletrônicas baseadas no *software* Microsoft Excel XP[®], desenvolvidas por Teófilo e Ferreira¹⁸⁸ e disponíveis no site <http://lqta.iqm.unicamp.br>.

Os gráficos normais dos efeitos para as respostas (k e N) dos dois ânions avaliados foram utilizados para a interpretação dos resultados obtidos, sendo mostrados nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Todos os efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância de 5% estão listados nas legendas. Os demais podem ser considerados inertes, tendo em vista que os seus valores situam-se em torno de zero.

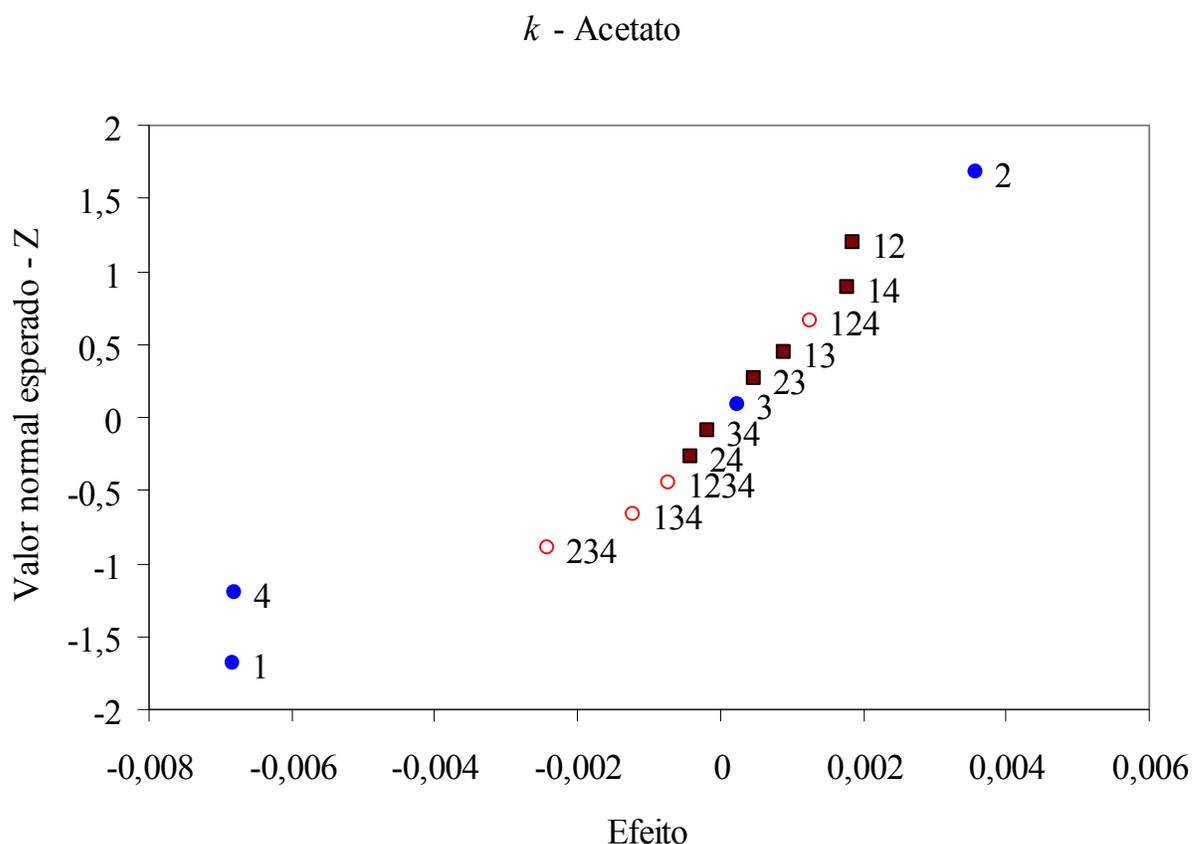


Figura 6. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de k (fator de retenção) para o íon acetato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1 e 4.

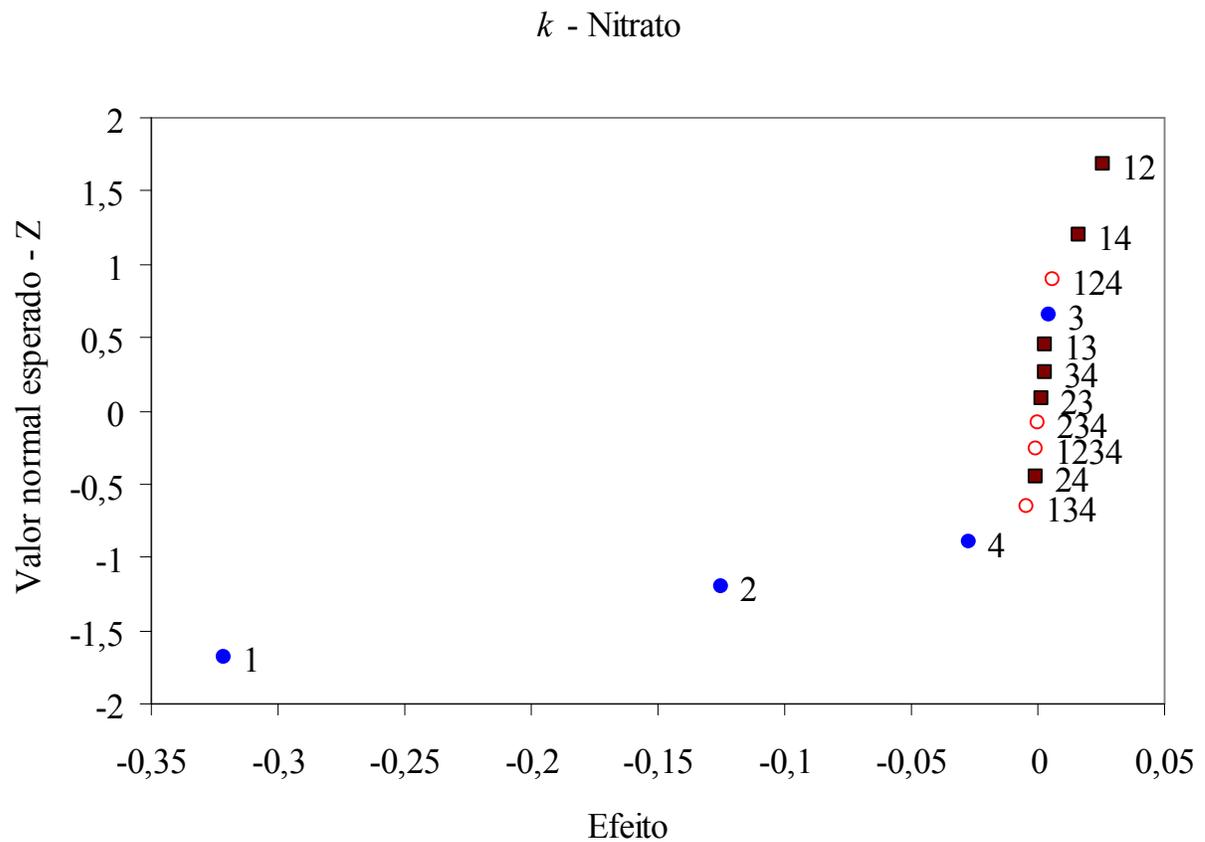


Figura 7. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de k (fator de retenção) para o íon nitrato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 4, 12 e 14.

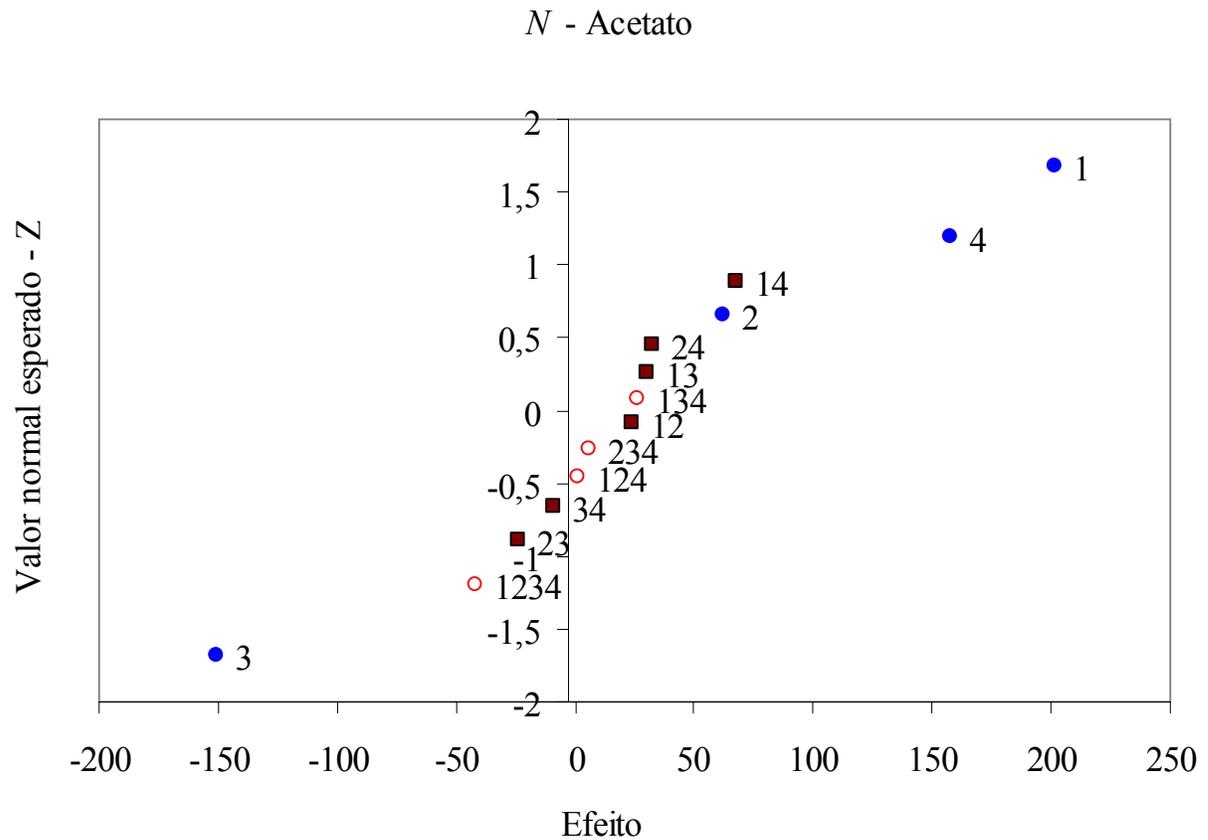


Figura 8. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de N (número de pratos) para o íon acetato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14, 23, 24, 1234 e 124.

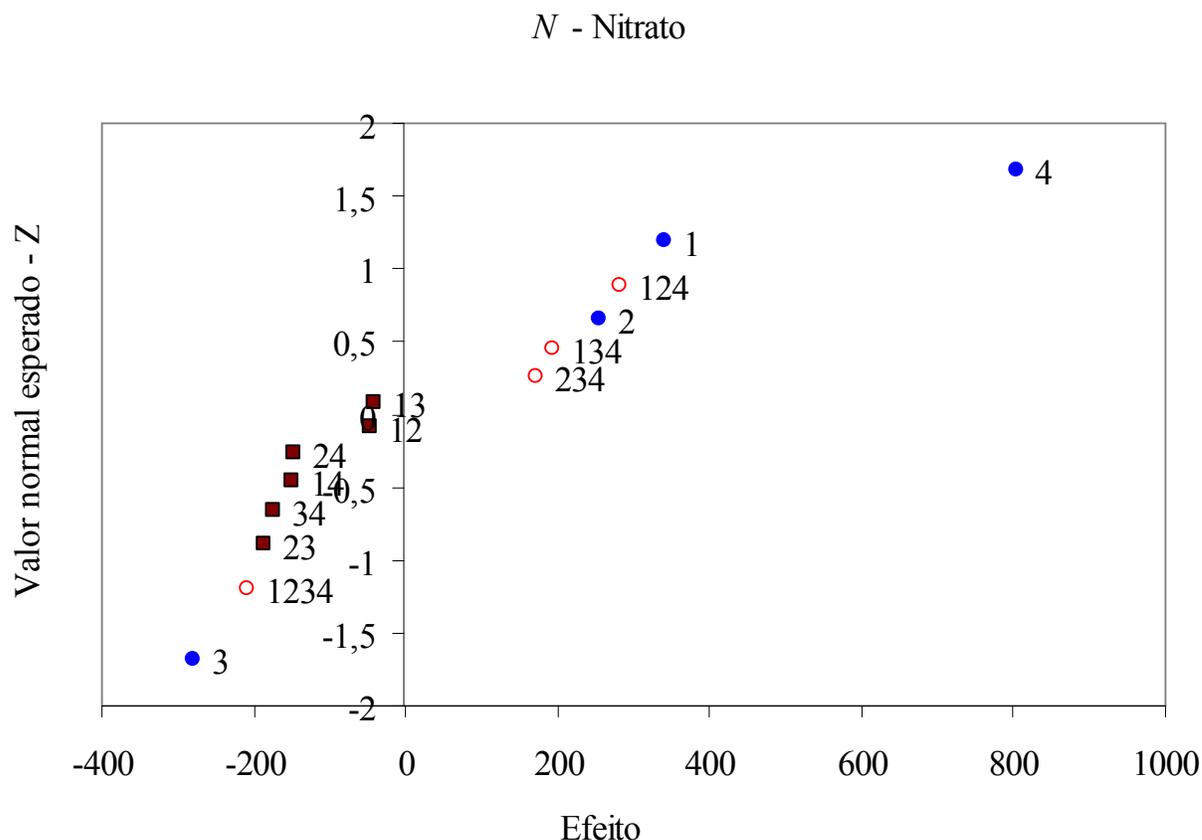


Figura 9. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados a partir dos dados de *N* (número de pratos) para o íon nitrato obtidos através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Efeitos significativos com 3 graus de liberdade a um nível de significância (α) de 0,05 (5%): 1, 2, 3, 4, 14, 23, 24, 34, 124, 134, 234 e 1234.

A clara tendência demonstrada pelos resultados dos ensaios realizados possibilita a interpretação dos dados com relativa simplicidade. Como é possível observar, poucos efeitos foram significativos para o fator de retenção (*k*) quando comparados ao número de efeitos significativos obtidos para o número de pratos (*N*).

De maneira geral, entre os fatores estudados, a presença de acetonitrila na fase móvel se mostrou a variável mais importante no processo de separação cromatográfica. Os resultados obtidos mostram que o aumento no teor deste solvente orgânico proporciona um aumento significativo na eficiência da separação dos íons selecionados, sobretudo para o íon acetato, e uma diminuição significativa da retenção dos mesmos sobre a fase estacionária, sobretudo para o íon nitrato.

Portanto, considerando os ganhos significativos na eficiência da separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato em menores tempos de análise, as condições finais otimizadas através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central são aquelas listadas na Tabela 12. Tais condições são descritas na matriz de planejamento da Tabela 11 para o ensaio 12, cujo cromatograma é ilustrado na Figura 10.

Tabela 12. Condições finais otimizadas através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central para a separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato em etanol.

Fator	Nível otimizado
1: Teor de acetonitrila	Superior: 10% ACN
2: Temperatura da coluna	Superior: 45°C
3: Vazão da fase móvel	Inferior: 0,7 mL min ⁻¹
4: Volume de injeção	Superior: 20 µL

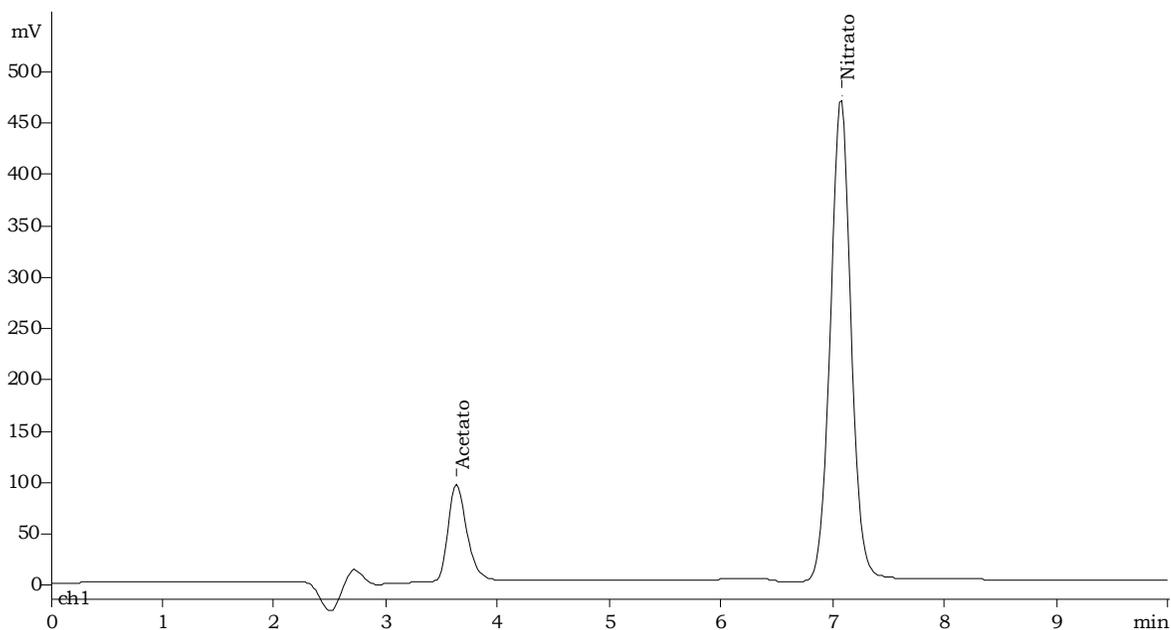


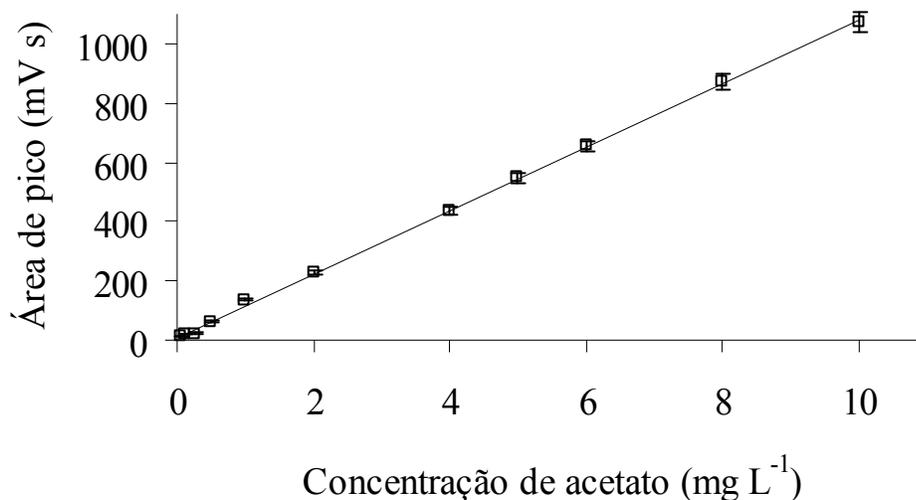
Figura 10. Cromatograma ilustrando a separação dos íons acetato e nitrato nas condições otimizadas através do planejamento fatorial completo 2^4 com quadruplicata no ponto central. Coluna Metrosep A Supp 5 (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C. Eluente composto por uma solução mista de Na_2CO_3 a 3,2 mmol L^{-1} , NaHCO_3 a 1 mmol L^{-1} e ACN a 10%, sob eluição isocrática a 0,7 mL min^{-1} . Volume de injeção de 20 μL . Solução padrão multicomponente preparada com o próprio eluente contendo 10 mg L^{-1} de cada analito.

IV.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após a etapa de planejamento e otimização dos experimentos para a separação cromatográfica dos íons acetato e nitrato, diversos ensaios foram efetuados visando estabelecer os principais parâmetros analíticos para a validação da metodologia desenvolvida. Adicionalmente, foram incluídos os ânions cloreto e sulfato nesta etapa do trabalho, já que os mesmos foram observados com frequência nas amostras analisadas, a fim de avaliar seus parâmetros analíticos. Os resultados são apresentados na Tabela 13. As Figuras 11, 12, 13 e 14 ilustram as curvas analíticas obtidas para os íons acetato, nitrato, cloreto e sulfato, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons acetato e nitrato em meio etanólico.

Parâmetro	Analito			
	Acetato	Nitrato	Cloreto	Sulfato
Sensibilidade (mV s L μmol^{-1})	6,3	36,5	40,6	71,3
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,05-10	0,01-10	0,01-10	0,01-10
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9995	0,9994	0,9971	0,9992
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20	2	0,2	0,6
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50	7	0,5	2
Precisão (%DPR)	0,7	2	7,7	1,3
Faixa de recuperação (%)	100-104	93-99	86-94	97-100

**Figura 11.** Curva analítica obtida para o íon acetato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,05-10 mg L⁻¹ (n = 11).

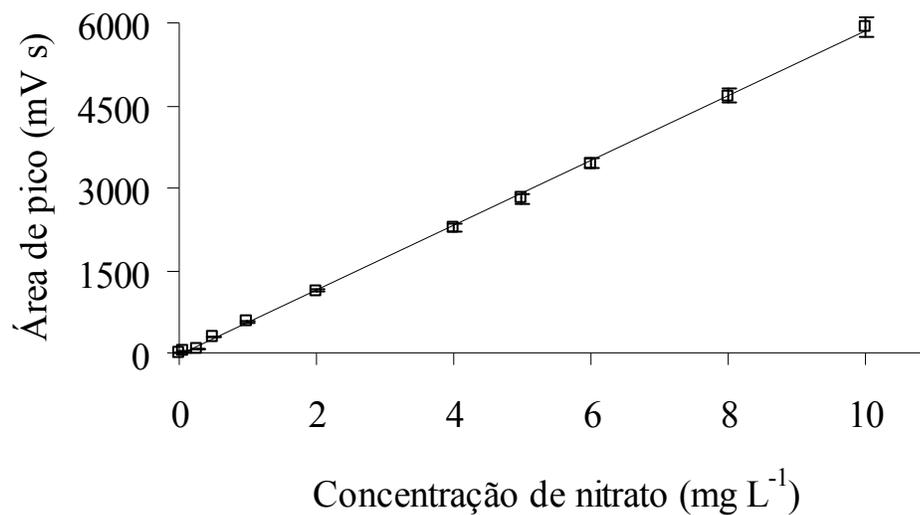


Figura 12. Curva analítica obtida para o íon nitrato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L⁻¹ (n = 11).

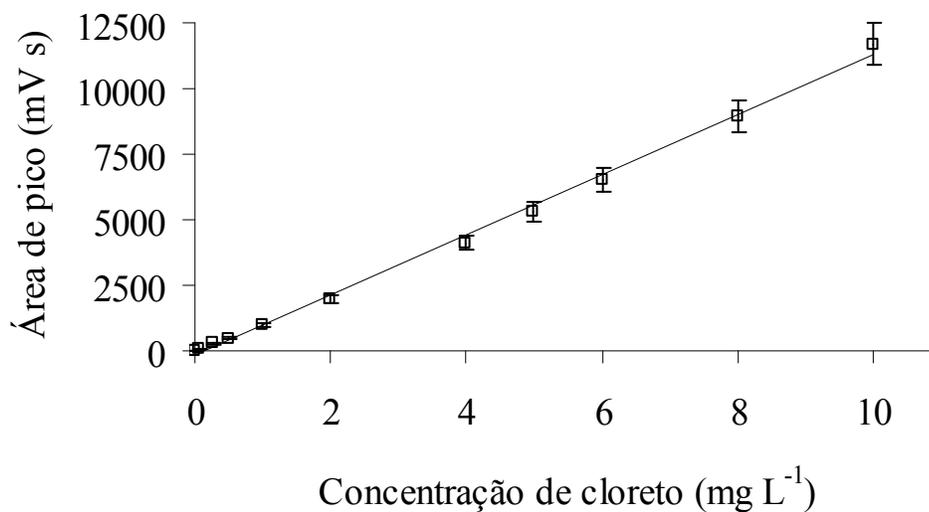


Figura 13. Curva analítica obtida para o íon cloreto nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L⁻¹ (n = 11).

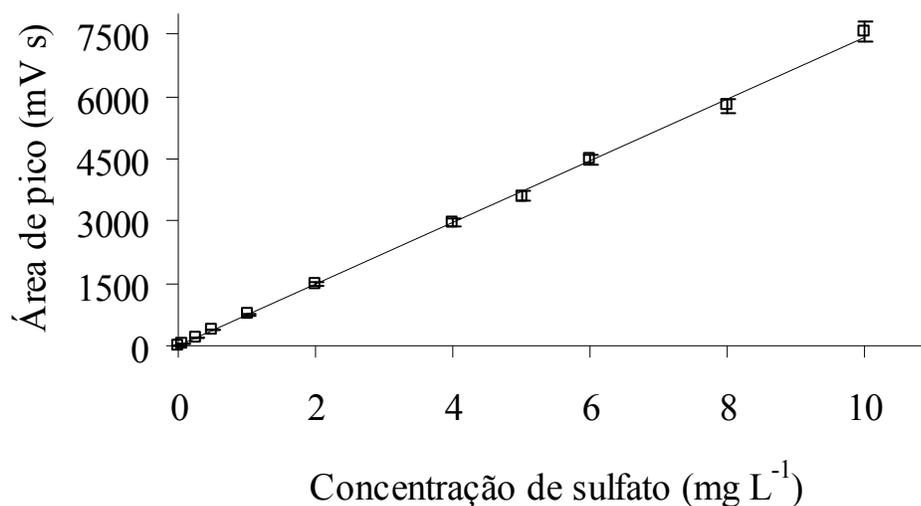


Figura 14. Curva analítica obtida para o íon sulfato nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L⁻¹ (n = 11).

De acordo com os dados da Tabela 13, é possível observar que a sensibilidade analítica encontrada para o íon nitrato é aproximadamente 5,8 vezes maior em relação àquela encontrada para o íon acetato. Isto pode ser explicado pelo fato do íon nitrato apresentar uma maior mobilidade iônica em solução. De maneira geral, foram obtidos ótimos resultados para os parâmetros analíticos de ambos os analitos (acetato e nitrato), bem como para os íons cloreto e sulfato, incluindo limites de detecção e quantificação da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo mais baixos que aqueles encontrados na literatura (Tabela 3), e uma ampla faixa linear de resposta. Os dados também demonstraram alta precisão e exatidão satisfatória, exceto para o íon cloreto, possivelmente devido à baixa solubilidade do cloreto de sódio (usado como padrão primário) em etanol.

A Figura 15 apresenta um cromatograma selecionado ilustrando a separação dos íons acetato e nitrato, juntamente com os íons cloreto e sulfato, contidos em uma solução padrão preparada em etanol puro.

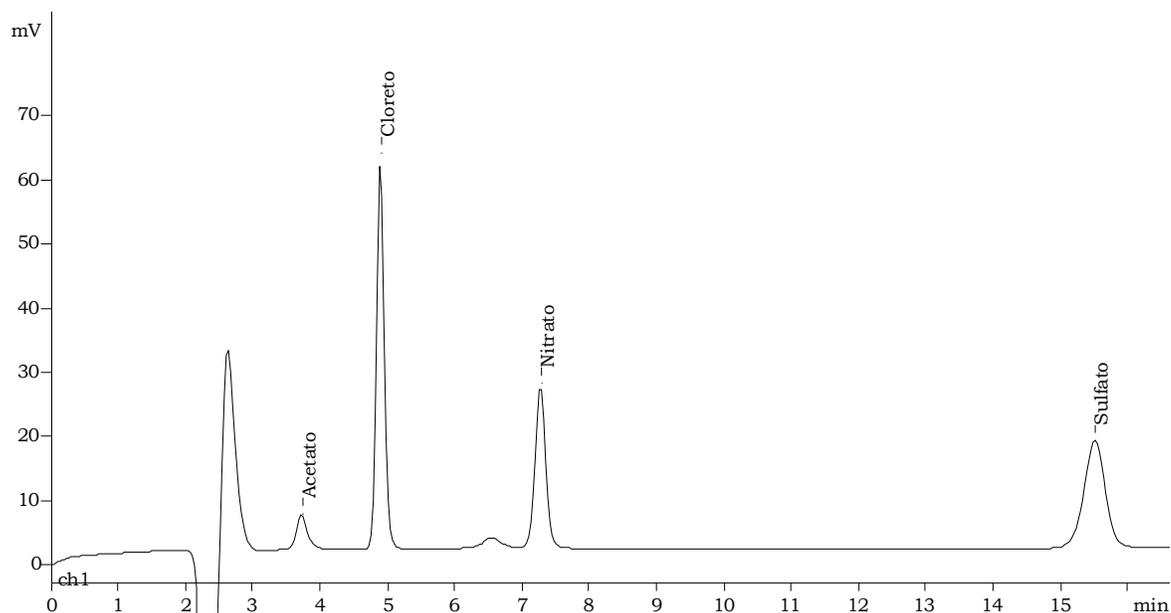


Figura 15. Cromatograma ilustrando a separação dos íons acetato e nitrato juntamente com os íons cloreto e sulfato nas condições previamente otimizadas, de acordo com a Tabela 12. Solução padrão multicomponente preparada em etanol puro contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada analito.

Diversas amostras de AEHC foram analisadas nas condições cromatográficas otimizadas. As concentrações encontradas para os íons avaliados variaram entre 1 e 10 mg L^{-1} para o íon acetato, entre 15 e $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o íon nitrato, entre 25 e $665 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o íon cloreto e entre $0,46$ e 6 mg L^{-1} para o íon sulfato. A Figura 16 ilustra a separação cromatográfica de uma amostra de AEHC analisada.

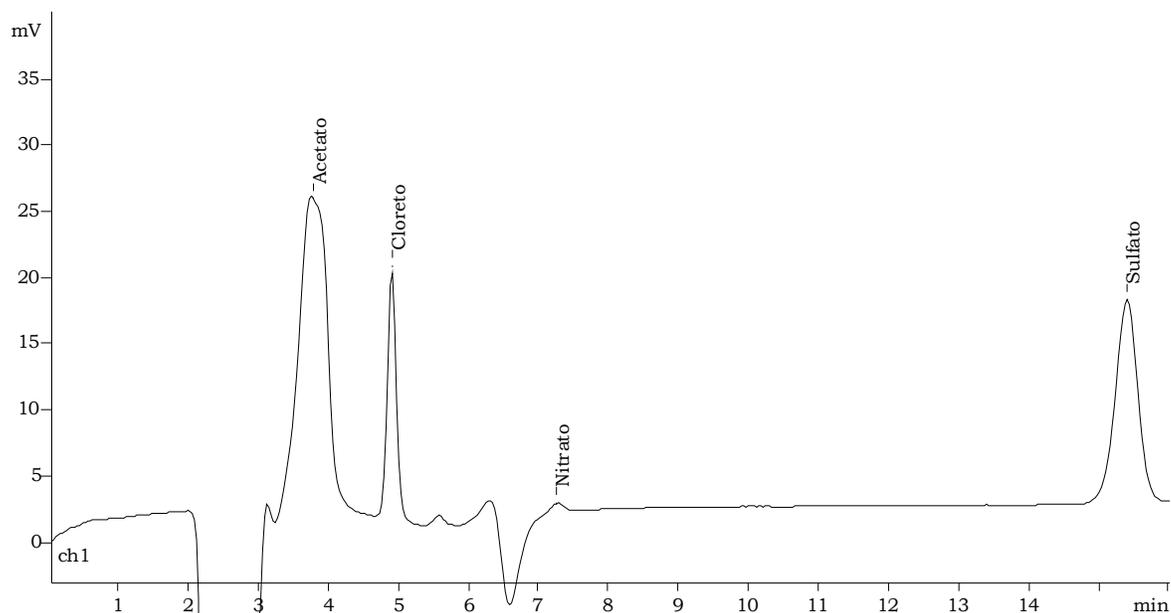


Figura 16. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes aniônicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) nas condições previamente otimizadas, de acordo com a Tabela 12. Concentrações determinadas para cada analito, em mg L^{-1} : 5,8 de acetato, 0,15 de cloreto, 0,015 de nitrato e 0,46 de sulfato.

O perfil observado para o pico do íon acetato no cromatograma ilustrado na Figura 16 sugere a influência da matriz orgânica (etanol) na separação deste analito, que é mais fracamente retido na fase estacionária.

CAPÍTULO V

Resultados e Discussão

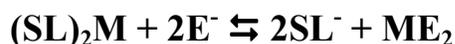
Íons Metálicos - Sistema ADPC

V.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

V.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O emprego do ácido dipicolínico (ADPC) em sistemas de eluição para a separação cromatográfica de íons metálicos é relatado em diversos trabalhos na literatura^{16-18,20,21,89}. Entretanto, nos casos onde este composto representa o agente quelante único ou principal do eluente, as concentrações normalmente empregadas giram em torno de 6 mmol L^{-1} , em valores de pH próximos ao valor do pK_{a-2} (4,76), para aplicações em soluções aquosas. Diante disso, no presente trabalho, um novo método cromatográfico foi desenvolvido para aplicação em matriz etanólica usando uma menor concentração de ADPC.

Os equilíbrios de complexação dos íons metálicos com os grupos quelantes das fases móvel e estacionária durante o processo de separação cromatográfica podem ser mais bem compreendidos com base na seguinte equação química¹⁸:



Onde,

M representa o íon metálico divalente;

$(\text{SL})_2\text{M}$ representa a retenção do quelato na fase estacionária;

E^- representa o agente quelante do eluente;

SL^- representa o substrato da coluna (sílica) funcionalizado com o ligante (AIDA);

ME_2 representa a eluição do quelato pela fase móvel.

Entretanto, múltiplos mecanismos de separação podem ocorrer. Diante disso, é importante considerar também que o emprego de eluentes ácidos sobre fases estacionárias funcionalizadas com grupamentos carboxila provoca o seguinte equilíbrio químico ¹⁸:



Na predominância deste segundo tipo de equilíbrio, o aumento da concentração de H^+ no eluente tende a enfraquecer os quelatos mais sensíveis à acidez do meio e, desta forma, acelerar a eluição. Neste caso, o mecanismo de separação é governado pelas diferenças nas constantes de equilíbrio de cada reação.

As estruturas dos complexos metálicos dos ácidos iminodiacético (AIDA) e dipicolínico (ADPC) são ilustradas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

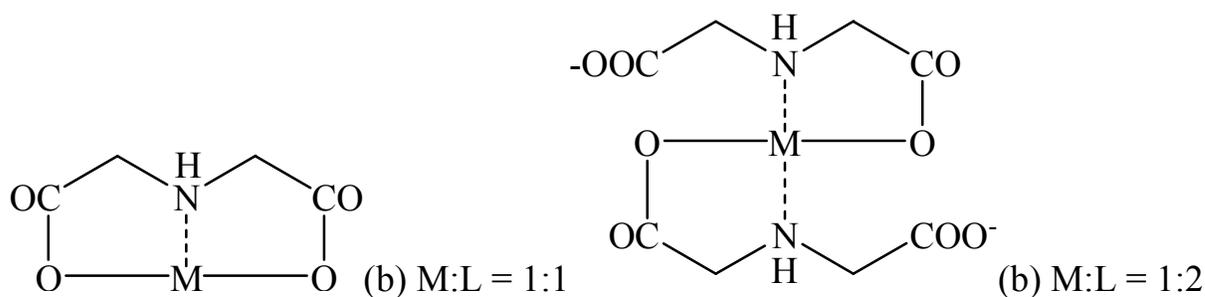


Figura 17. Estruturas dos complexos metálicos do ácido iminodiacético (AIDA). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração.

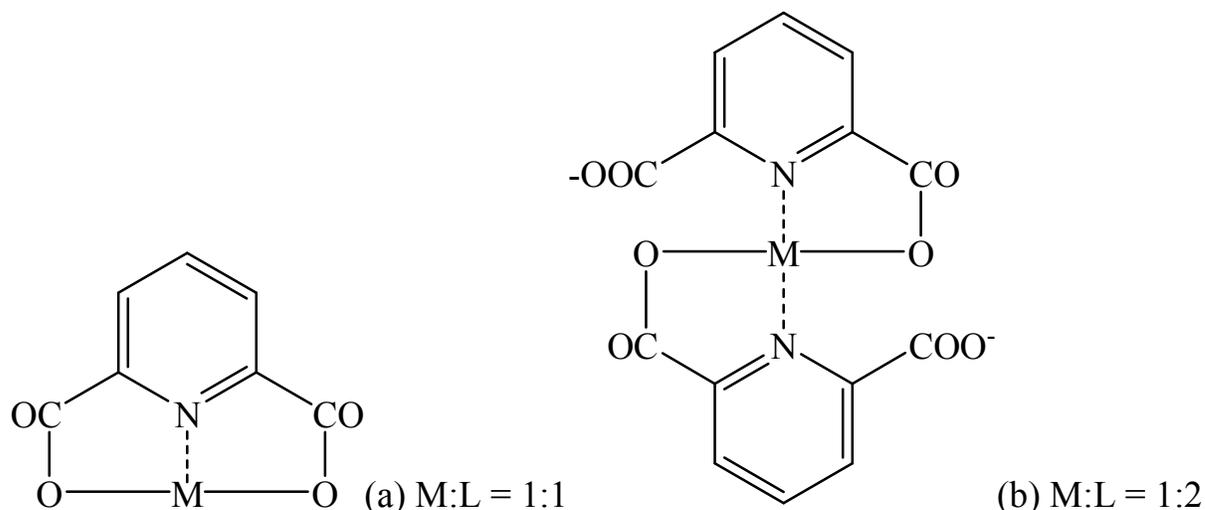


Figura 18. Estruturas dos complexos metálicos do ácido dipicolínico (ADPC). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração.

Quando um eluente complexante é usado, o processo cinético se torna mais difícil. Neste caso, a retenção dos analitos é influenciada, de maneira geral, pelo tipo e concentração do ligante da fase estacionária, pelo tipo e concentração do ligante da fase móvel e pelo pH do eluente.

Os elementos retidos mais fortemente sobre a fase estacionária apresentam, em geral, um grau de complexação mais elevado com o ácido iminodiacético e, conseqüentemente, uma cinética de reação mais lenta. Por outro lado, quanto maior o grau de complexação entre o íon metálico e o agente quelante presente na fase móvel, menor a retenção do elemento na fase estacionária. Entretanto, alguns metais são eluídos mais rapidamente devido à predominância do mecanismo de separação regido por interações eletrostáticas. Desta forma, estes elementos apresentam um grau de complexação menor, como os íons Mn(II) e Fe(II), por exemplo, considerando os valores das constantes de estabilidade listados na Tabela 9.

A partir do próximo item são apresentados os resultados referentes ao processo de otimização univariada da separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre para o sistema ADPC.

Os resultados obtidos estão subdivididos de acordo com as etapas analíticas efetuadas. De maneira geral, os seguintes parâmetros cromatográficos foram avaliados: tempo de retenção, número de pratos e fator de assimetria, todos em função dos seguintes fatores: concentração do agente quelante (ADPC), acidez do meio (concentração de HCl), concentração do modificador orgânico (metanol) e temperatura da coluna. O efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica também foi analisado.

Inúmeros experimentos foram realizados com diferentes colunas, sob diversos sistemas de eluição. As colunas utilizadas são à base de sílica funcionalizada com o grupamento ácido iminodiacético (AIDA) e os sistemas de eluição à base de ácido dipicolínico (ADPC), conforme descrito previamente na metodologia. As principais características das colunas cromatográficas empregadas são descritas na Tabela 6. As fórmulas estruturais dos ácidos orgânicos constituintes das fases móvel e estacionária, assim como suas constantes de dissociação, são apresentadas na Tabela 8 e as constantes de estabilidade dos complexos formados são listadas na Tabela 9.

Ensaio preliminares realizados com um sistema de eluição composto por uma solução de ADPC a 3 mmol L^{-1} em pH 2 mostraram que o ferro(II) apresenta uma oxidação contínua ao longo do tempo, conforme pode ser verificado no gráfico da Figura 19, que ilustra a razão Fe(III)/Fe(II) em função do tempo.

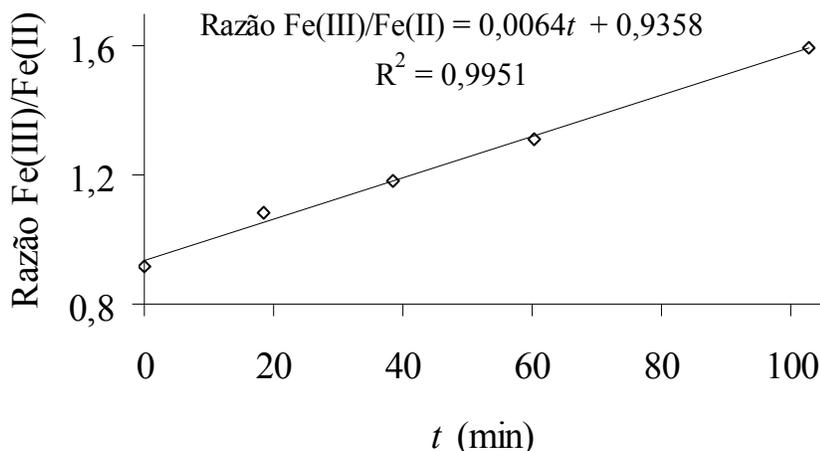


Figura 19. Dependência linear da razão Fe(III)/Fe(II) em função do tempo.

Diante desses resultados, o tempo entre o preparo de cada solução padrão e a sua injeção no cromatógrafo foi controlado de forma a minimizar os efeitos da oxidação do ferro(II) sobre a eficiência cromatográfica das duas espécies de ferro.

V.1.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADPC

Inicialmente, o efeito da concentração do agente quelante contido na fase móvel sobre alguns parâmetros cromatográficos foi avaliado. Para isso, diferentes concentrações de ADPC foram testadas, variando entre 1 e 4 mmol L⁻¹, mantendo o pH constante em 2 para evitar a hidrólise dos metais.

Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 20, 21 e 22, que mostram como o tempo de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, de cada íon metálico variam em função da concentração de ADPC na fase móvel.

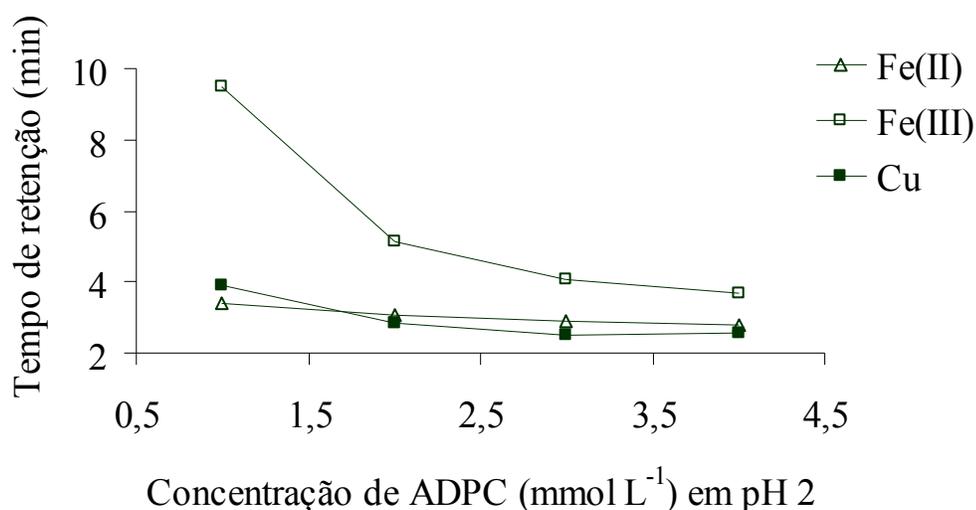


Figura 20. Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida à temperatura ambiente (23-25°C). Eluente à base de ADPC, com pH ajustado para 2 com solução de HCl, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas com o próprio eluente contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento.

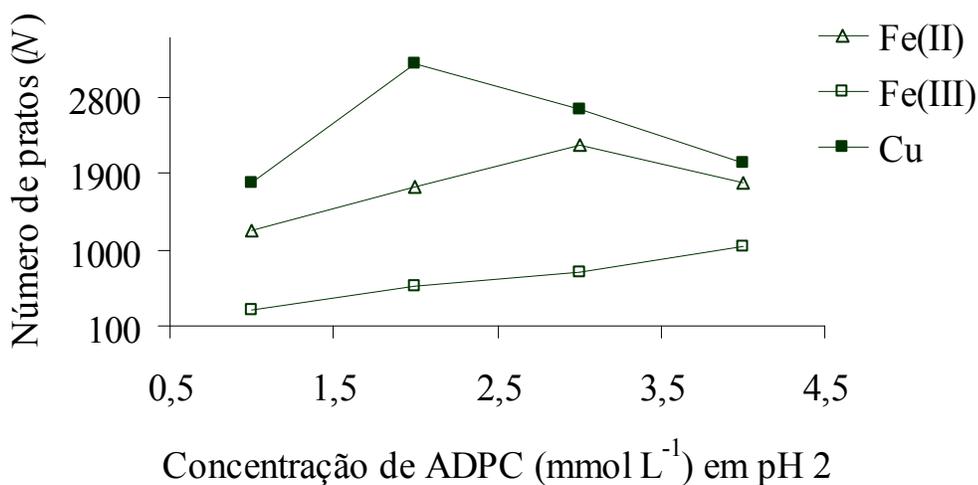


Figura 21. Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20.

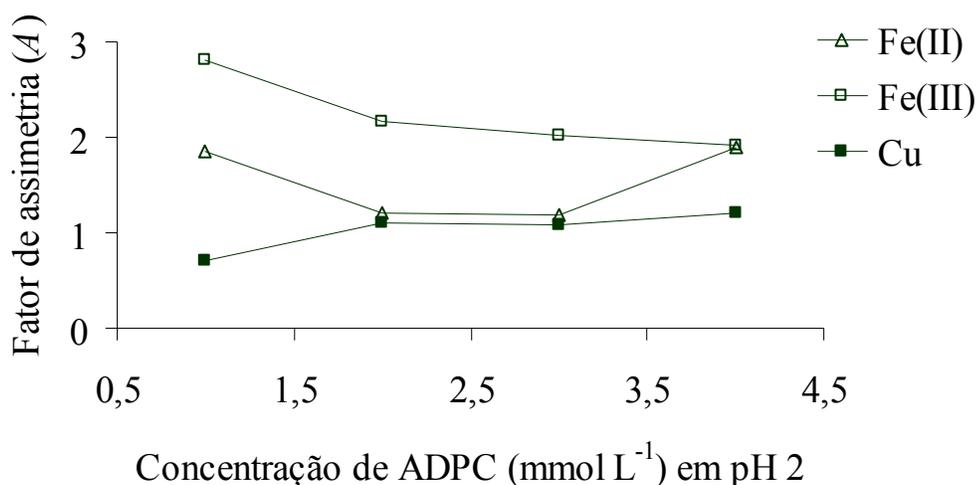


Figura 22. Efeito da concentração de ácido dipicolínico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20.

De maneira geral, a variação da concentração do agente quelante, em pH constante, vai influenciar no grau de complexação dos metais e, portanto, nos tempos de retenção dos mesmos.

Analisando o gráfico da Figura 20, é possível observar que a retenção dos analitos diminui com o aumento da concentração de ADPC, sobretudo para o ferro(III), que apresentou uma cinética de reação mais lenta. Entretanto, os íons ferro(II) e cobre foram retidos mais fracamente e eluídos muito próximos entre si.

A ordem de eluição dos analitos para a menor concentração de ADPC testada corrobora com os valores das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os íons metálicos e os grupos quelantes, tanto o ADPC quanto o AIDA. Entretanto, a retenção do cobre parece incompatível com a ordem de magnitude de suas constantes de estabilidade, as quais sugerem uma retenção mais intensa para este elemento em relação ao ferro(II). Isto pode ser explicado pela ocorrência de mecanismos múltiplos no processo de separação cromatográfica, onde as atrações eletrostáticas parecem prevalecer sobre os equilíbrios de complexação para os íons

ferro(II) e cobre, devido à força iônica do meio, influenciando diretamente no fator de seletividade.

Por outro lado, a eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 21, apresentou um perfil ascendente para as duas espécies de ferro com o aumento da concentração de ADPC, enquanto para o cobre a eficiência máxima foi obtida com a concentração do agente quelante em 2 mmol L^{-1} .

A qualidade dos picos também apresentou uma tendência geral de melhora com o aumento da concentração do agente quelante, aproximando o fator de assimetria da unidade (Figura 22) quando as concentrações de ADPC variaram entre 2 e 3 mmol L^{-1} .

Portanto, com base nos parâmetros cromatográficos avaliados, visando obter uma separação satisfatória em um tempo de análise adequado, as concentrações de 2 e 3 mmol L^{-1} de ADPC foram as que proporcionaram o melhor desempenho neste sentido. Por isso, uma concentração intermediária de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ADPC foi empregada nos ensaios subsequentes. As Figuras 23 e 24 apresentam os cromatogramas referentes às concentrações selecionadas.

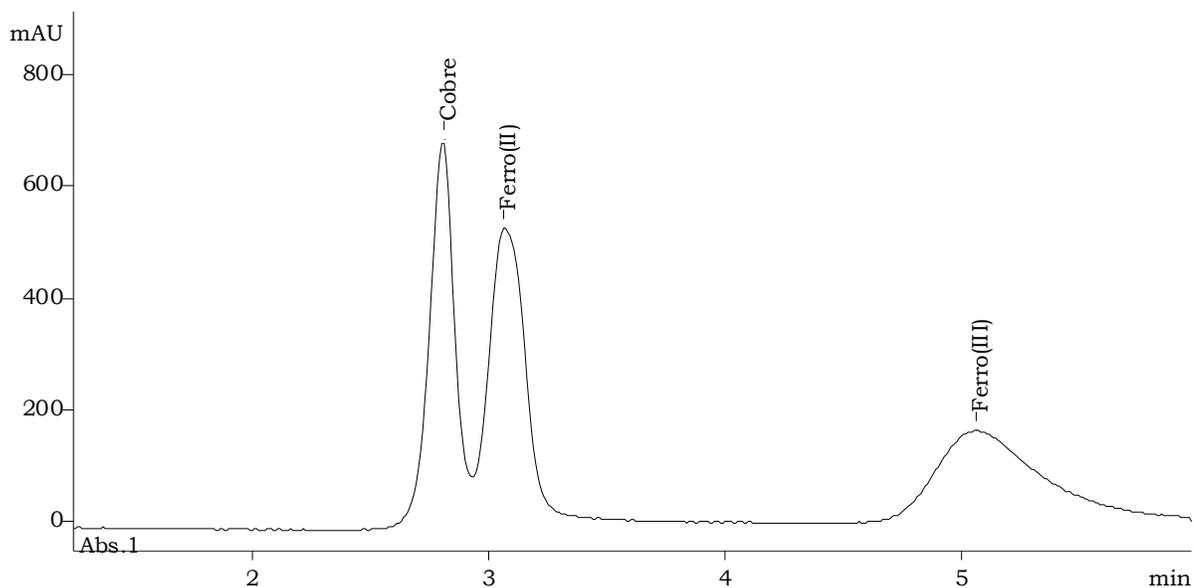


Figura 23. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. Eluente contendo ADPC na concentração de 2 mmol L⁻¹.

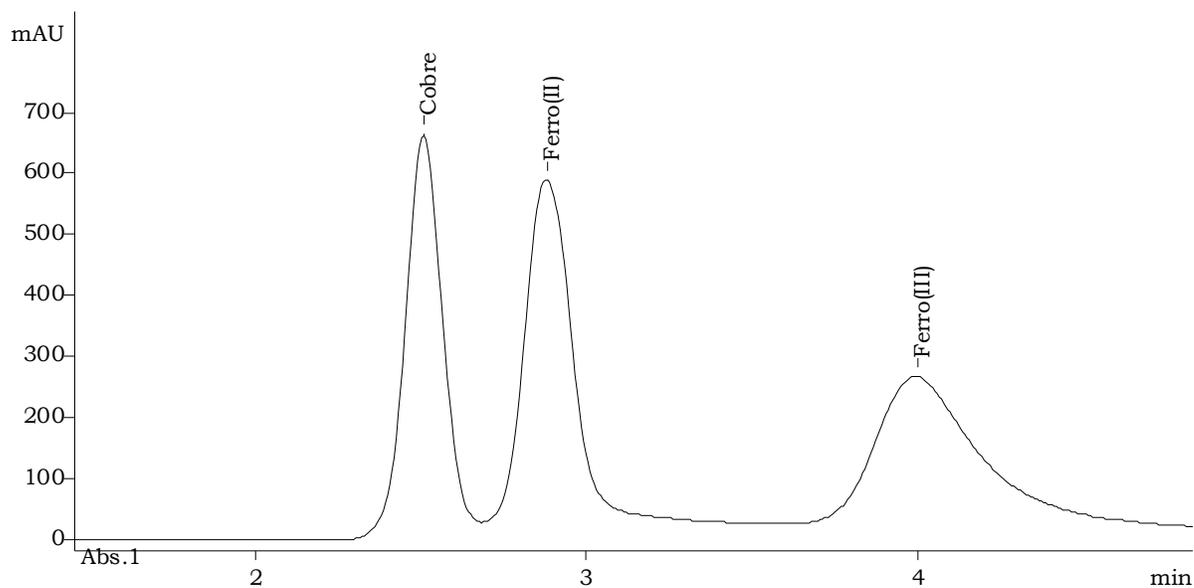


Figura 24. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 20. Eluente contendo ADPC na concentração de 3 mmol L⁻¹.

O efeito da matriz etanólica sobre a separação cromatográfica não foi verificado nos ensaios anteriores, tendo em vista que os mesmos foram realizados com soluções padrão preparadas com o próprio eluente. Por isso, não foi possível visualizar os picos de injeção nos cromatogramas apresentados nas Figuras 23 e 24.

Portanto, embora os resultados obtidos nesta etapa inicial do trabalho tenham sido satisfatórios para soluções aquosas, alguns ajustes foram necessários nas condições experimentais para que o efeito da matriz orgânica fosse minimizado. Para isso, com base nos dados de viscosidades de misturas de solventes em função da composição ¹⁷⁷, mostrados na Figura 1, o metanol foi escolhido como modificador orgânico da fase móvel em uma concentração inicial de 20%, a fim de aproximar as condições de análise à matriz de interesse. Por esse motivo, em vez de ajustar os valores de pH, as concentrações de HCl foram fixadas durante a etapa subsequente de otimização da acidez do meio, mantendo-se constante a temperatura da coluna.

V.1.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HCl

A otimização da acidez do meio foi executada através da análise de alguns parâmetros cromatográficos em função do conteúdo de HCl na fase móvel. Desta forma, diferentes concentrações de HCl foram testadas, variando entre 5 e 20 mmol L⁻¹, e as concentrações de ADPC e MeOH foram fixadas em 2,5 mmol L⁻¹ e 20%, respectivamente. Além disso, a temperatura da coluna foi mantida em 30°C e as soluções padrão utilizadas foram preparadas em etanol puro.

Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 25, 26 e 27, que mostram como o tempo de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, de cada íon metálico variam em função da concentração de HCl na fase móvel.

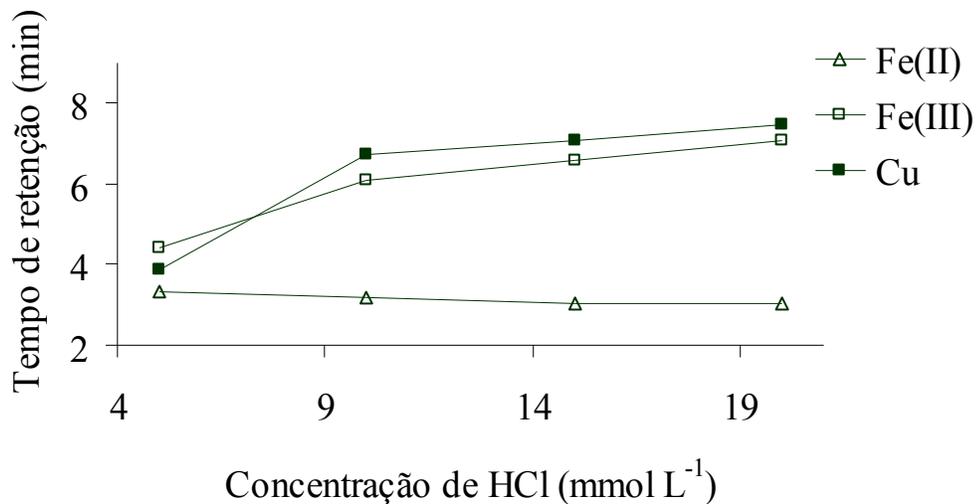


Figura 25. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹ e MeOH a 20%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento.

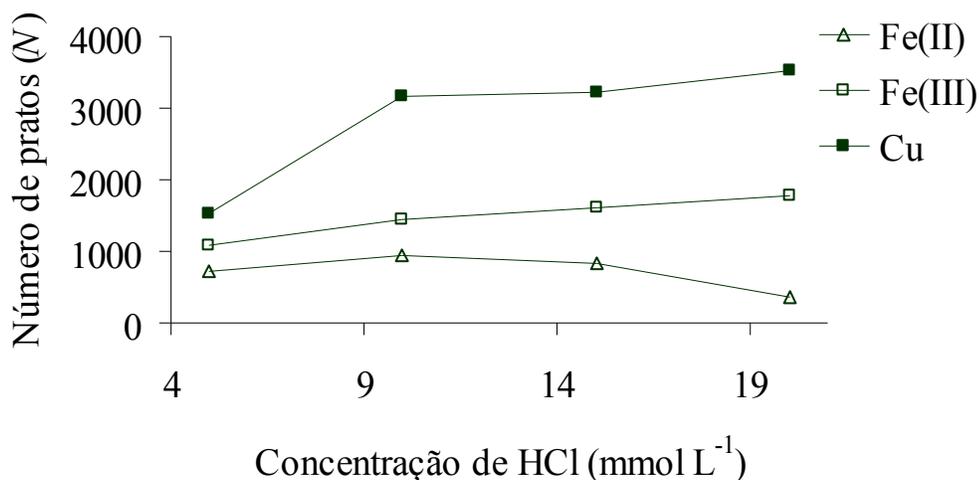


Figura 26. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25.

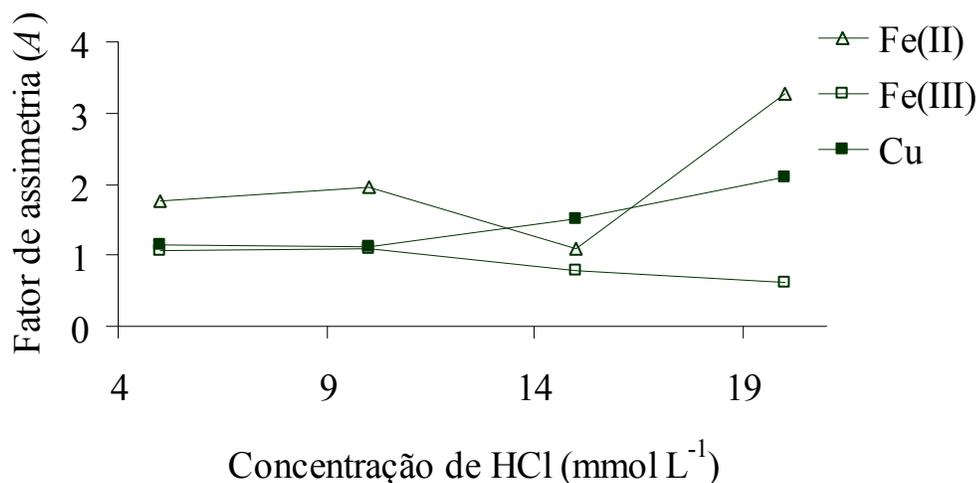


Figura 27. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25.

Analisando o gráfico da Figura 25, é possível observar que a retenção dos íons ferro(III) e cobre aumenta com a acidez do meio, enquanto a retenção do ferro(II) apresenta uma tendência de diminuição. Isto sugere a existência de diferentes mecanismos envolvidos no processo de separação cromatográfica.

A retenção de íons metálicos em CLQI depende, sobretudo, dos equilíbrios de complexação que ocorrem entre as fases móvel e estacionária, sendo governados pelas constantes de estabilidade dos complexos formados. No caso do ferro(II), por exemplo, possivelmente o mecanismo de separação prevalecente envolve o processo de troca iônica através de interações eletrostáticas, considerando os menores valores das constantes de estabilidade para este metal com ambos os ácidos e a sua fraca retenção sobre a fase estacionária. Por outro lado, a cinética das reações de complexação envolvendo os íons ferro(III) e cobre parece ser mais lenta em condições mais ácidas, mas desta vez o comportamento desses dois analitos se mostrou compatível com a ordem de grandeza de suas constantes de estabilidade.

Similar ao perfil apresentado pelo tempo de retenção, a eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 26, apresentou uma tendência geral de aumento para os íons ferro(III) e cobre com o incremento da concentração de HCl, enquanto o ferro(II) apresentou um comportamento inverso.

A qualidade dos picos se mostrou mais adequada quando as concentrações de HCl variaram entre 5 e 10 mmol L⁻¹, onde os valores para o fator de assimetria se aproximaram mais da unidade (Figura 27).

Diante do exposto, embora a maior concentração de HCl tenha proporcionado os melhores resultados para a eficiência cromatográfica dos íons ferro(III) e cobre, o aumento da acidez do meio aproxima o pico de ferro(II) do volume morto e, conseqüentemente, causa distorções no perfil do pico. Isto pode ser observado através da comparação dos cromatogramas referentes às concentrações de 5 e 10 mmol L⁻¹ de HCl, apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Além disso, o aumento da concentração de HCl também provoca o aumento da força iônica do meio. Conseqüentemente, a fase móvel possui mais íons cloreto que grupos carboxila. Isto significa que o equilíbrio de complexação pode ser afetado pela presença de cloreto, que também forma complexos estáveis com certos metais de transição, por exemplo, o ânion FeCl_4^- . Portanto, a concentração de 5 mmol L^{-1} de HCl se mostrou mais adequada de maneira geral, sendo usada nos ensaios posteriores.

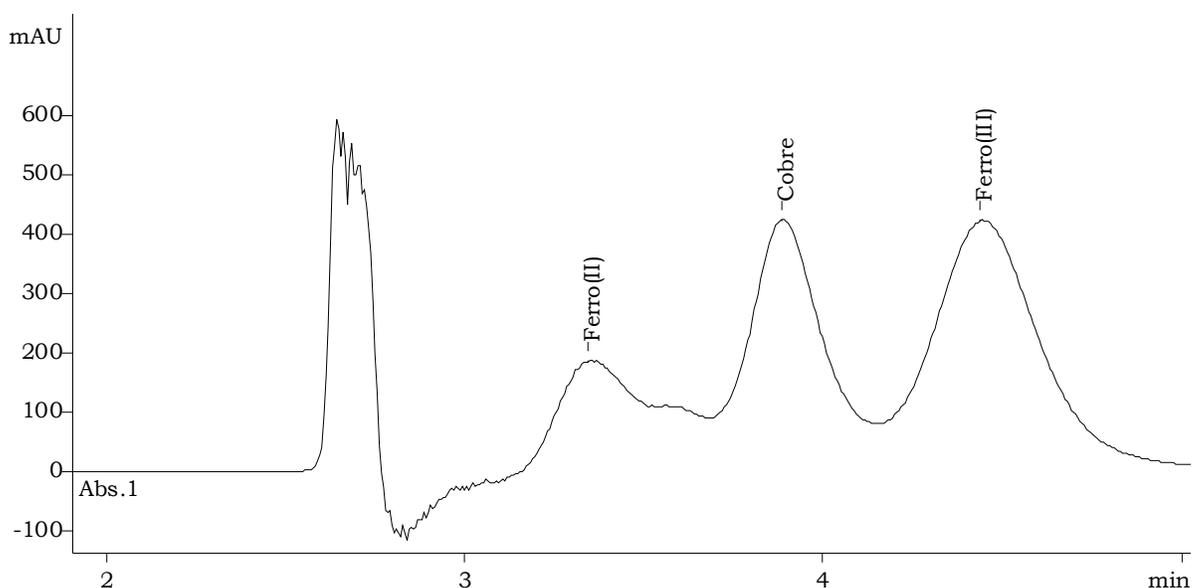


Figura 28. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. Eluente contendo HCl na concentração de 5 mmol L^{-1} .

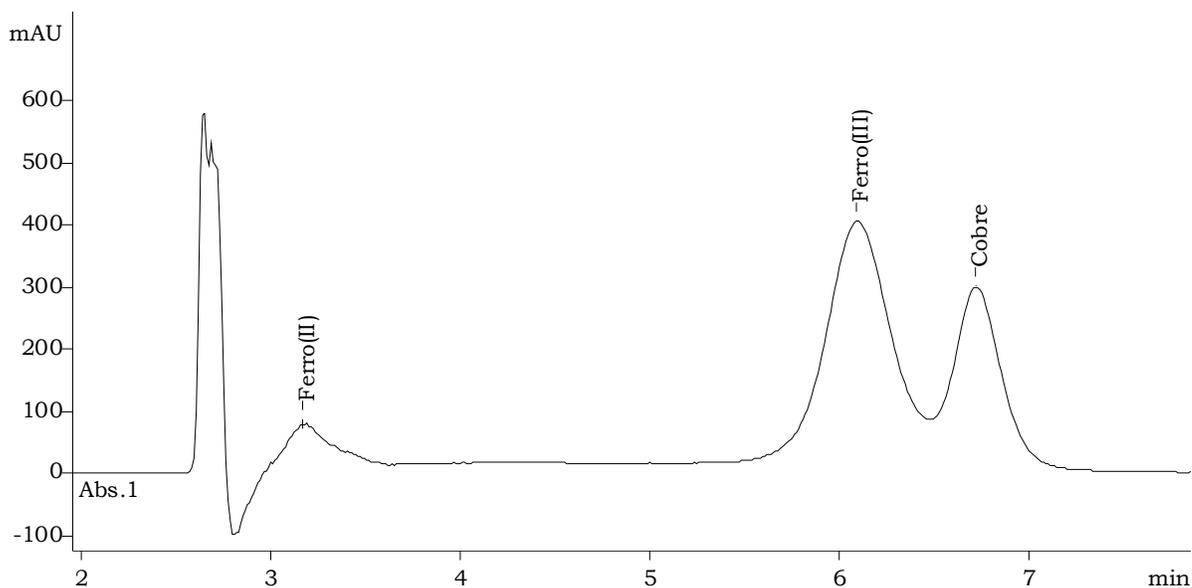


Figura 29. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 25. Eluente contendo HCl na concentração de 10 mmol L^{-1} .

V.1.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MeOH

Embora o emprego de 20% de metanol na fase móvel tenha proporcionado bons resultados, conforme discutido anteriormente, outros teores deste solvente orgânico foram testados com a finalidade de reduzir os efeitos de matriz, principalmente sobre o ferro(II), cuja separação se mostrou, em geral, relativamente rápida e pouco eficiente devido aos efeitos de dispersão deste analito entre as fases orgânica e aquosa ao longo do processo de difusão na coluna cromatográfica.

De forma similar aos ensaios anteriores, a otimização da concentração de MeOH foi executada através da análise de alguns parâmetros cromatográficos em função do conteúdo deste solvente na fase móvel. Para isso, diferentes concentrações de MeOH foram testadas, variando entre 20 e 60%, e as demais

condições, previamente otimizadas e descritas no item anterior, foram mantidas constantes.

Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 30, 31 e 32, que mostram como o tempo de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, variam em função da concentração de MeOH na fase móvel.

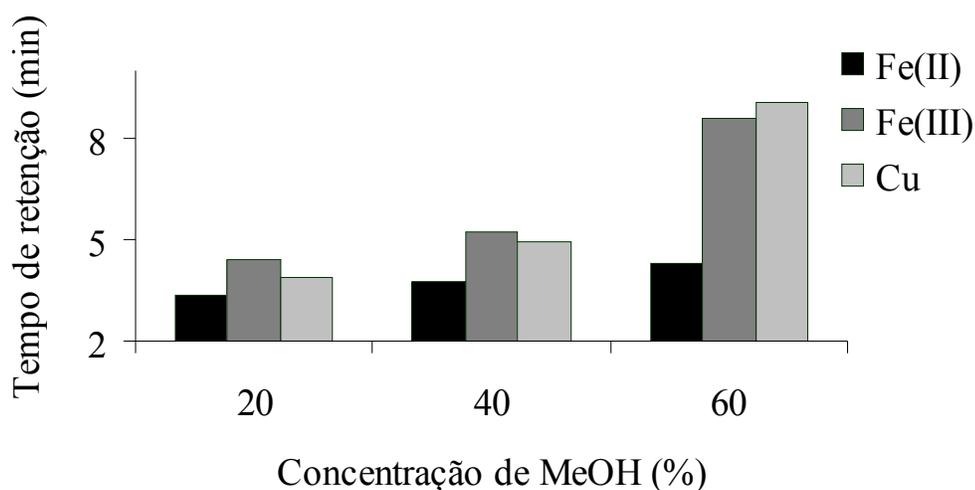


Figura 30. Efeito da concentração de metanol sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹ e HCl a 5 mmol L⁻¹, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento.

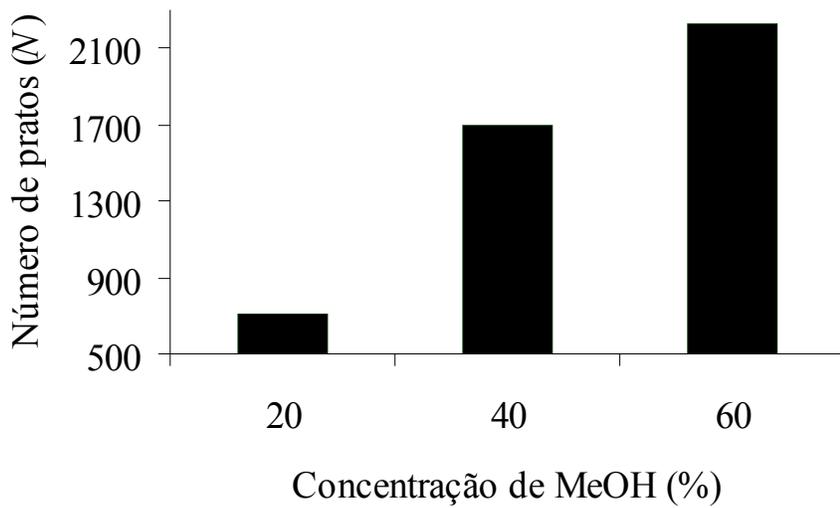


Figura 31. Efeito da concentração de metanol sobre o número de pratos do íon ferro(II). Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30.

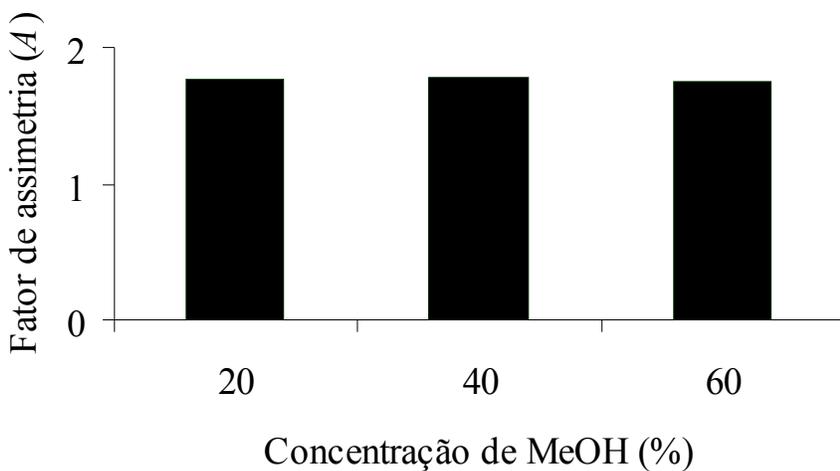


Figura 32. Efeito da concentração de metanol sobre o fator de assimetria do íon ferro(II). Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30.

Analisando o gráfico da Figura 30, é possível observar que a retenção dos três analitos aumenta com o aumento da concentração de MeOH na fase móvel, sobretudo para os íons ferro(III) e cobre, sugerindo uma cinética de reação mais lenta para estes dois analitos. Entretanto, conforme se observa nos cromatogramas ilustrados nas Figuras 33 e 34, referentes aos ensaios efetuados com os teores de 40 e 60% de MeOH, respectivamente, os íons ferro(III) e cobre foram eluídos muito próximos entre si e, portanto, seus picos apresentaram baixa resolução nestas condições. Além disso, ocorreu uma inversão na ordem de eluição destes analitos, sugerindo que em concentrações de MeOH maiores de 60% a separação dos íons ferro(III) e cobre se tornaria mais seletiva.

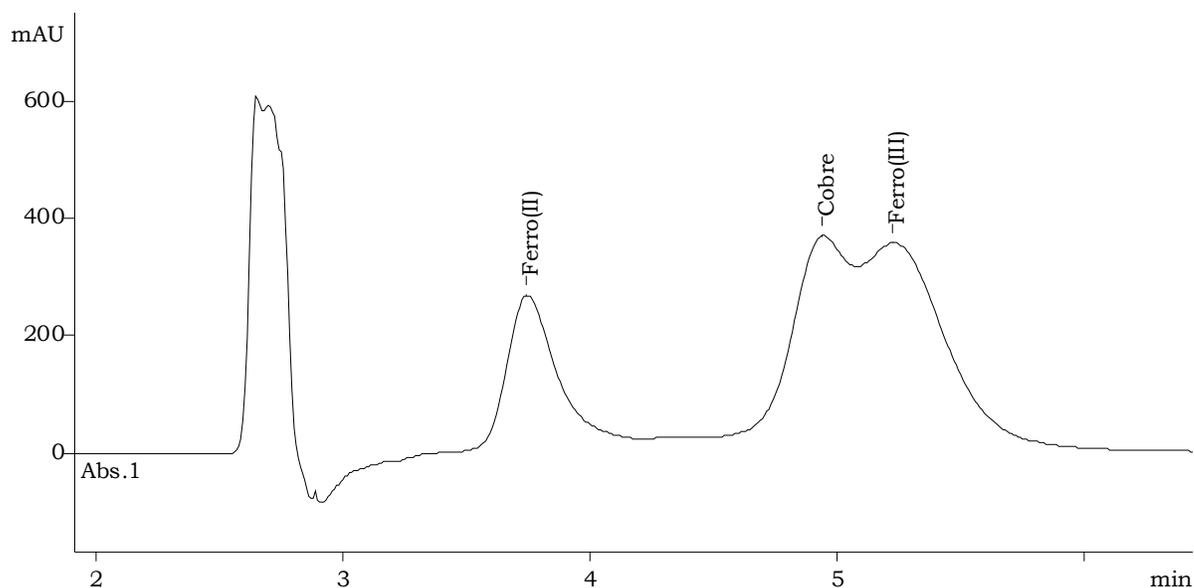


Figura 33. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. Eluente contendo 40% de MeOH. Resolução entre os picos de ferro(III) e cobre igual a 0,49.

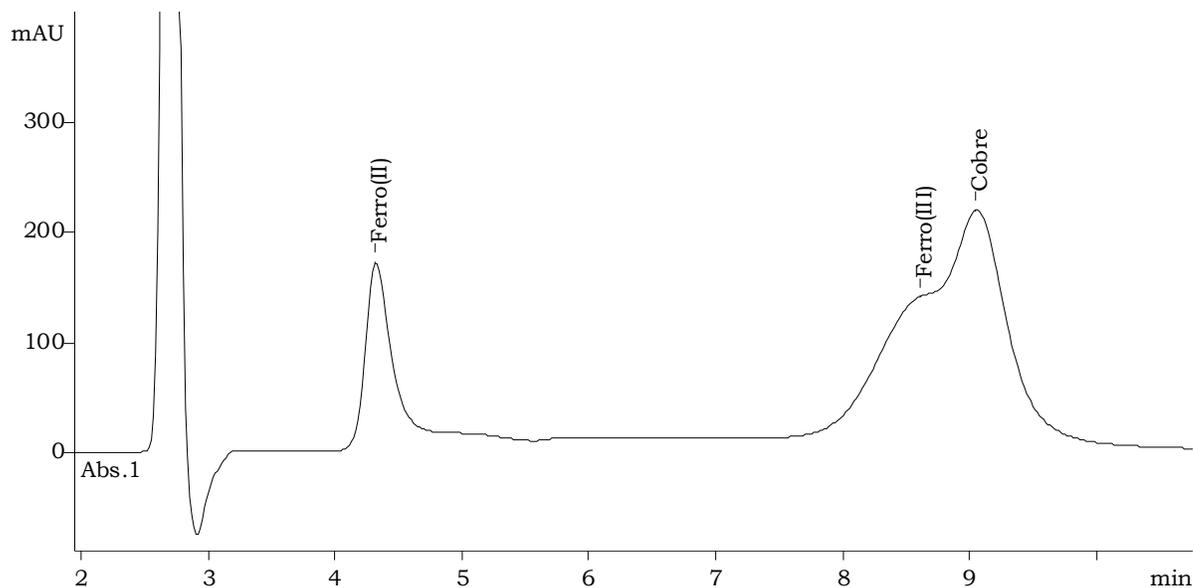


Figura 34. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 30. Eluente contendo 60% de MeOH. Resolução entre os picos de ferro(III) e cobre igual a 0,52.

Diante do exposto, devido à baixa resolução entre os picos de ferro(III) e cobre, os seus dados referentes ao número de pratos e ao fator de assimetria não foram considerados e, por isso, não são apresentados nos gráficos das Figuras 31 e 32.

Portanto, considerando que o emprego de 60% de MeOH na fase móvel proporcionou um aumento na retenção do íon ferro(II), assim como na sua eficiência cromatográfica, esta concentração foi selecionada para os testes subsequentes de otimização da temperatura da coluna.

V.1.5 EFEITO DA TEMPERATURA DA COLUNA

A influência da temperatura da coluna sobre a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre foi investigada após a otimização da composição da fase móvel na faixa compreendida entre 25 e 45°C. Para isso, a retenção dos analitos foi analisada através da construção do gráfico de van't Hoff, ilustrado na Figura 35.

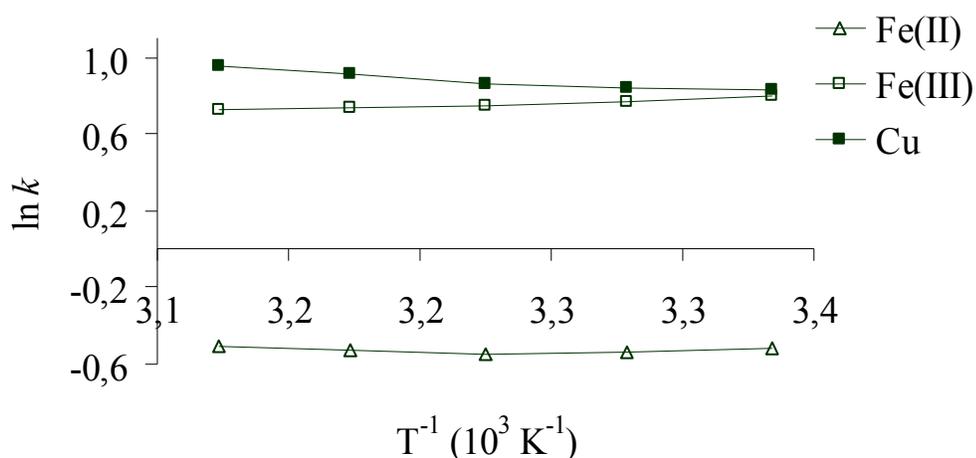


Figura 35. Gráfico de van't Hoff. Efeito da temperatura da coluna sobre a retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Eluente composto por uma solução mista de ADPC a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, HCl a 5 mmol L^{-1} e MeOH a 60%, sob eluição isocrática a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento.

No caso do íon ferro(II), os valores obtidos para o $\ln k$ foram constantes dentro dos limites do erro experimental na faixa de temperatura investigada. Para os íons ferro(III) e cobre, a regressão linear dos dados produziu as seguintes relações entre o $\ln k$ e a temperatura absoluta da coluna:

Ferro(III)

$$\ln k = 331,5T^{-1} - 0,32 \quad (7)$$

$$R^2 = 0,926$$

Cobre

$$\ln k = -614,7T^{-1} + 2,9 \quad (8)$$

$$R^2 = 0,936$$

A variação de entalpia de transição do soluto entre as fases móvel e estacionária, $\Delta H_{m \rightarrow e}$, foi calculada com base no coeficiente angular da reta, b , de acordo com a Equação (9) ¹⁷:

$$b = -\frac{\Delta H_{m \rightarrow e}}{R} \quad (9)$$

Considerando $R = 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, as seguintes variações de entalpia foram calculadas:

Ferro(III)

$$\Delta H_{m \rightarrow e} = -2,8 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Cobre

$$\Delta H_{m \rightarrow e} = +5,1 \text{ kJ mol}^{-1}$$

De acordo com Nesterenko e Jones ²⁰, as entalpias de adsorção de íons metálicos são dependentes do mecanismo envolvido no processo de separação cromatográfica. No caso da troca iônica convencional, os efeitos da temperatura são exotérmicos e as entalpias de adsorção não ultrapassam de 8-13 kJ mol⁻¹. Já em sistemas cromatográficos onde predomina o mecanismo de quelação de íons, os valores de entalpia são, em geral, mais elevados e ambos os efeitos, endotérmico e exotérmico, podem ser observados. Assim sendo, o aspecto termodinâmico do efeito da temperatura da coluna pode ter uma influência significativa sobre a seletividade da separação.

Diante do exposto, o valor negativo obtido para o $\Delta H_{m \rightarrow e}$ do íon ferro(III) sugere um mecanismo predominantemente regido pelo processo de troca iônica para a separação cromatográfica deste cátion. Por outro lado, o valor positivo do $\Delta H_{m \rightarrow e}$ para o íon cobre indica a predominância do mecanismo de separação governado por equilíbrios de complexação.

De forma análoga às etapas anteriores de otimização, a eficiência da separação cromatográfica e a qualidade dos picos também foram avaliadas. Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 36 e 37, que mostram como o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, variam em função da temperatura da coluna.

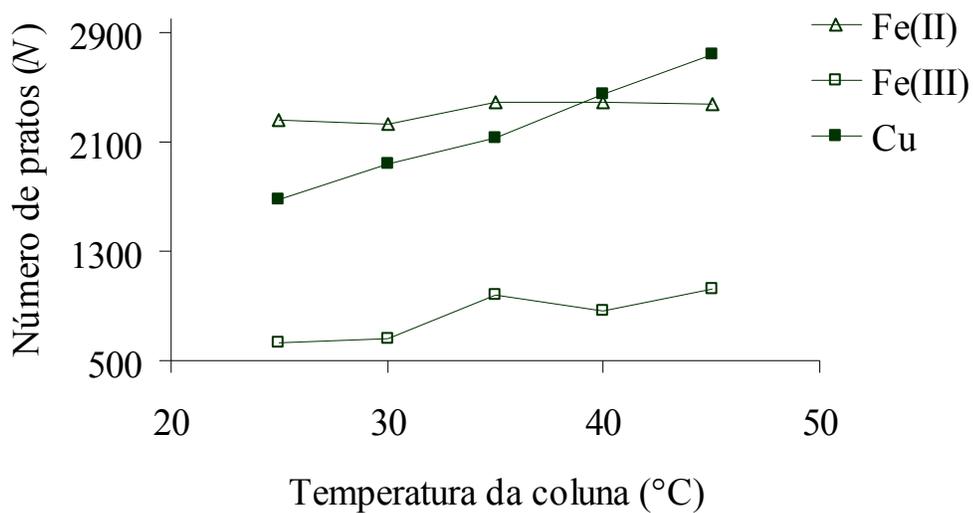


Figura 36. Efeito da temperatura da coluna sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35.

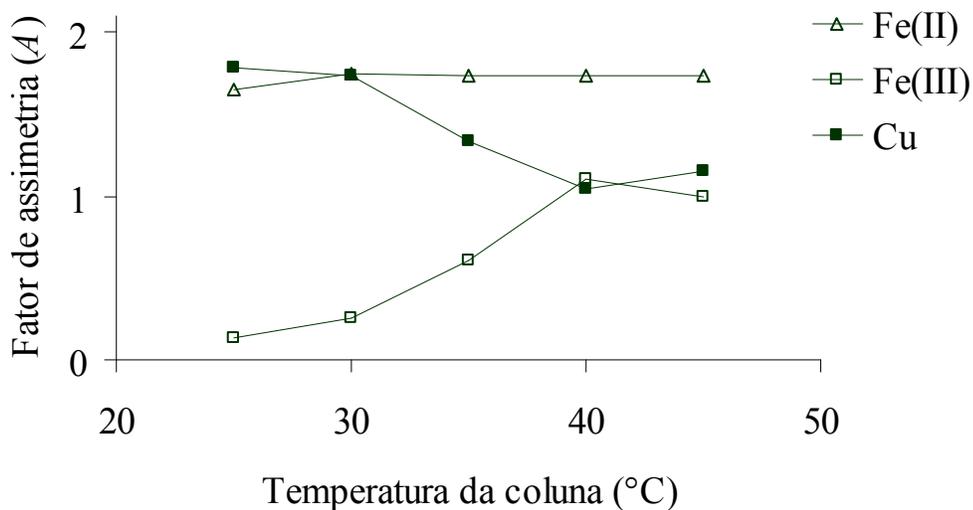


Figura 37. Efeito da temperatura da coluna sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35.

A eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 36, apresentou uma tendência crescente com o aumento da temperatura da coluna, sobretudo para o cobre, seguido pelo ferro(III). Contudo, pouca variação foi observada para o ferro(II) neste sentido.

De maneira geral, a qualidade dos picos também se mostrou mais adequada em temperaturas mais elevadas, onde os valores obtidos para o fator de assimetria se aproximam da unidade (Figura 37).

Portanto, com base nos parâmetros cromatográficos avaliados, visando obter uma separação mais eficiente com picos mais simétricos, a temperatura da coluna otimizada foi de 45°C. As Figuras 38 e 39 apresentam os cromatogramas referentes às duas temperaturas mais elevadas, as quais proporcionaram os melhores desempenhos, incluindo o aumento da resolução entre os picos de ferro(III) e cobre em relação à etapa de otimização anterior.

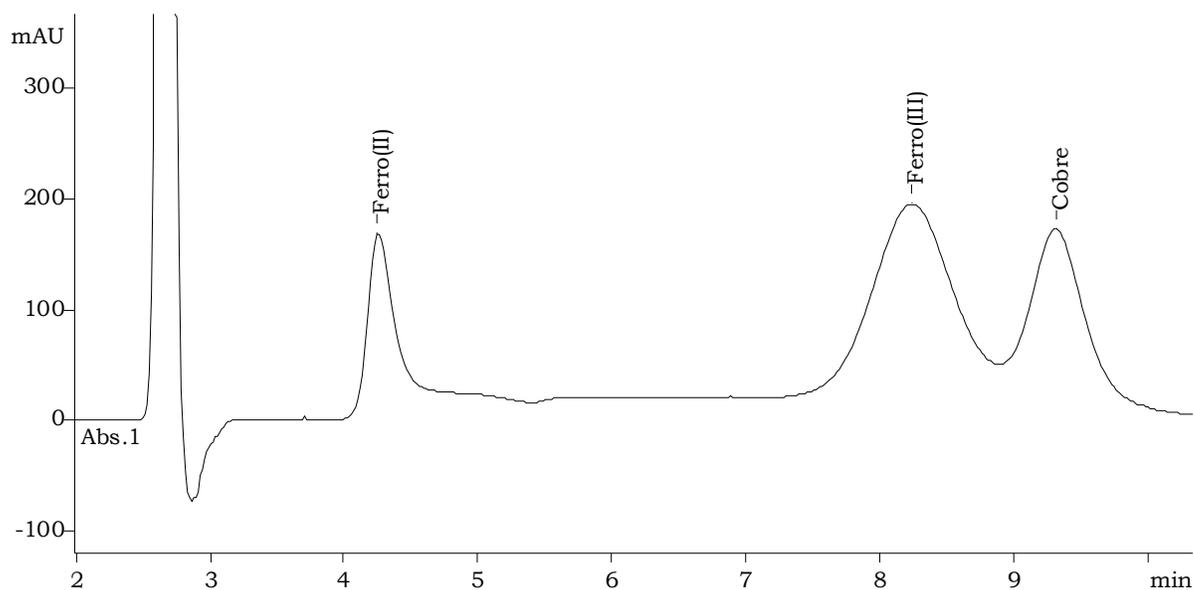


Figura 38. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. Temperatura da coluna mantida em 40°C.

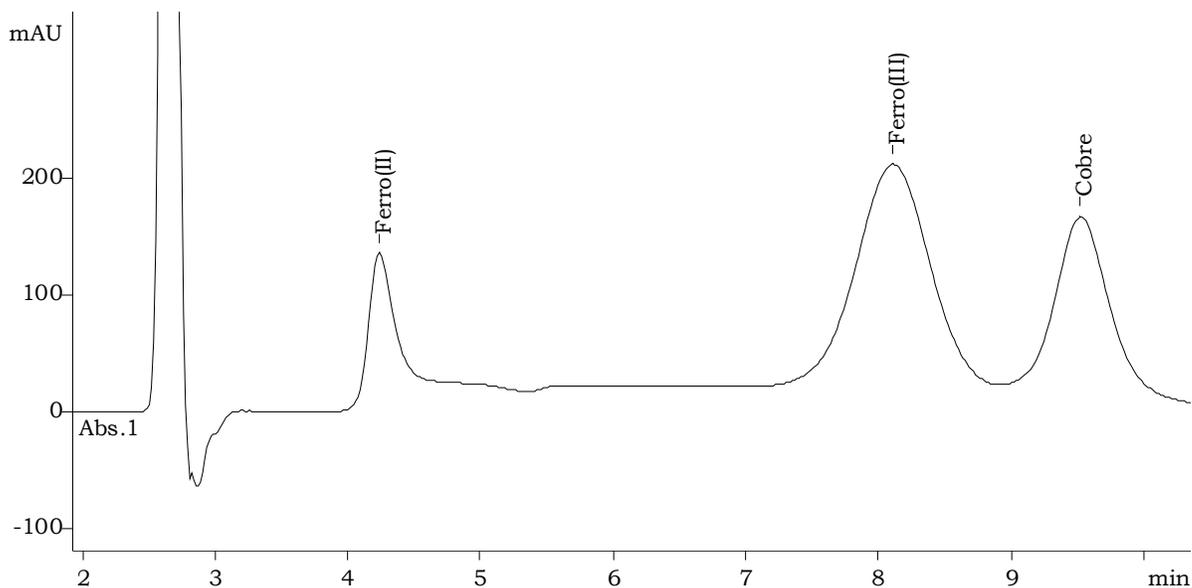


Figura 39. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 35. Temperatura da coluna mantida em 45°C.

V.1.6 EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL

A influência da vazão da fase móvel sobre a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre foi avaliada na faixa compreendida entre 0,5 e 1 mL min^{-1} . Para isso, a eficiência da separação dos analitos foi analisada através da construção da curva de van Deemter, ilustrada na Figura 40.

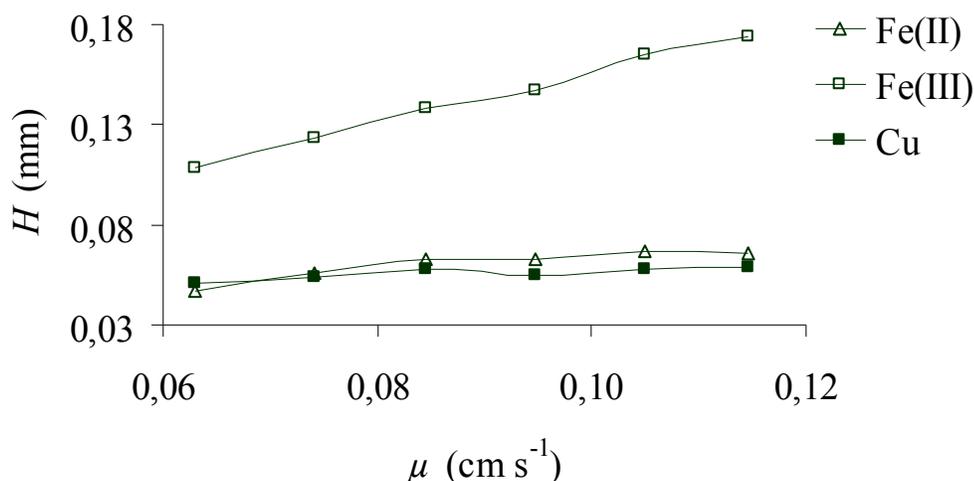


Figura 40. Curva de van Deemter. Efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 45°C. Eluente composto por uma solução mista de ADPC a 2,5 mmol L⁻¹, HCl a 5 mmol L⁻¹ e MeOH a 60%. Volume de injeção de 100 μL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. *H*: altura de prato; μ : velocidade linear da fase móvel.

A curva de van Deemter permite determinar a velocidade linear da fase móvel na qual a eficiência da coluna seja máxima. O mínimo dessa curva representa a vazão ótima.

A análise das curvas de van Deemter, esboçadas na Figura 40, indica que o efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica foi mais pronunciado para as duas espécies de ferro, sobretudo para aquela de maior valência, que teve uma redução em torno de 38% na sua eficiência com o aumento da vazão contra aproximadamente 28 e 15% para os íons ferro(II) e cobre, respectivamente.

Uma proporcionalidade inversa existe entre a vazão da fase móvel e o tempo de retenção resultante. Por outro lado, um aumento da vazão é limitado pela pressão máxima suportada pela coluna.

No caso do sistema proposto neste trabalho, a vazão da fase móvel tem forte influência na cinética das reações, considerando que a etapa de detecção envolve o processo de derivatização pós-coluna, onde as reações de complexação dependem da razão de mistura entre o efluente da coluna e a solução contendo o reagente cromóforo, sendo esta última transportada pelo sistema por uma bomba peristáltica, cuja vazão é limitada neste tipo de acoplamento devido aos pulsos gerados, que causam instabilidade na linha de base.

Portanto, considerando o comportamento observado para as duas espécies de ferro, o compromisso entre a eficiência da separação e o tempo de análise deve ser respeitado. Neste caso, a vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, correspondente à velocidade linear da fase móvel de $0,063 \text{ cm s}^{-1}$, se mostrou mais adequada para aplicações práticas.

O cromatograma referente ao ensaio realizado na vazão escolhida é mostrado na Figura 41. Conforme é possível observar, ocorre uma elevação na altura da linha de base entre os picos das espécies de ferro. Isto sugere a instabilidade do ferro(II), que parece oxidar continuamente até ferro(III), considerando que após a eluição do segundo a linha de base tende a voltar para o nível próximo de zero. Por essa razão, o pico do ferro(II) apresentou valores mais elevados para o fator de assimetria, conforme pode ser verificado no gráfico da Figura 42.

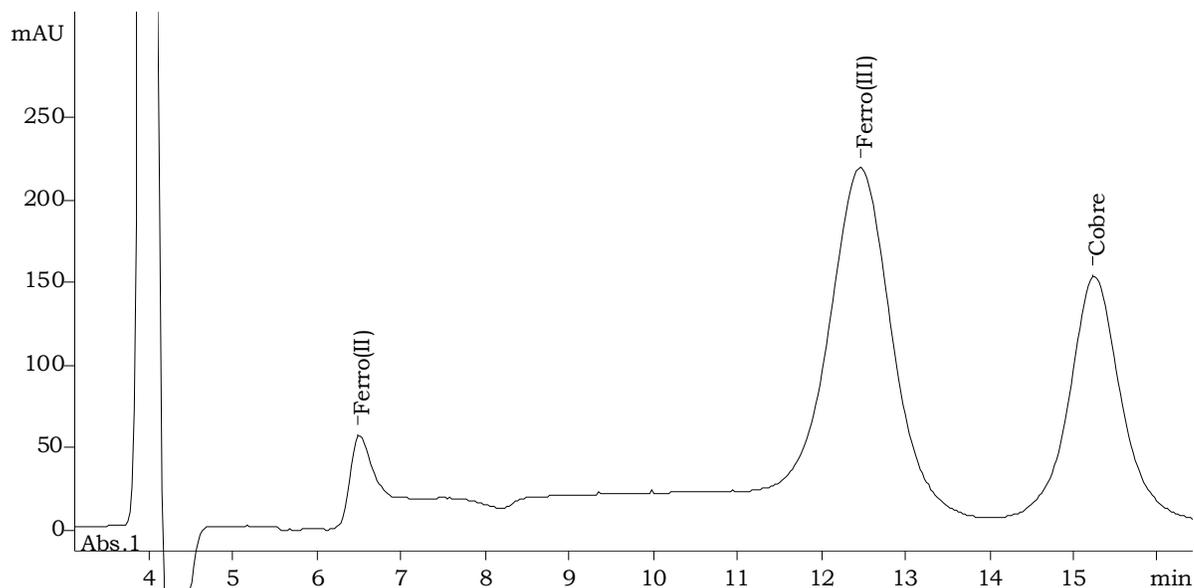


Figura 41. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 40. Vazão da fase móvel de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

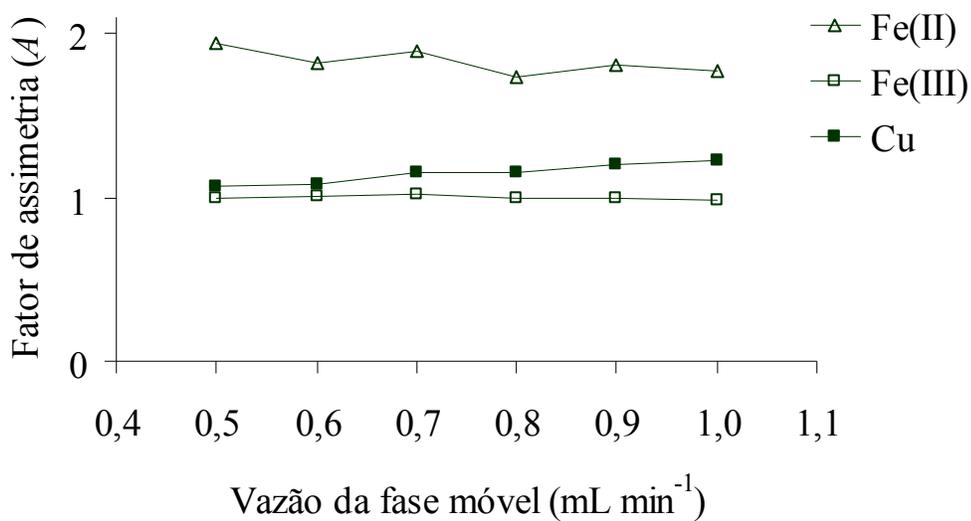


Figura 42. Efeito da vazão da fase móvel sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 40.

V.1.7 INTERFERÊNCIA DE OUTROS METAIS

Ao final dos procedimentos de otimização univariada dos diversos fatores envolvidos no processo de separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre, a interferência de outros metais foi avaliada nas condições pré-estabelecidas.

O diagrama apresentado na Figura 43 ilustra a seletividade da separação cromatográfica obtida para os íons de interesse na presença dos seguintes elementos: Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Zn.

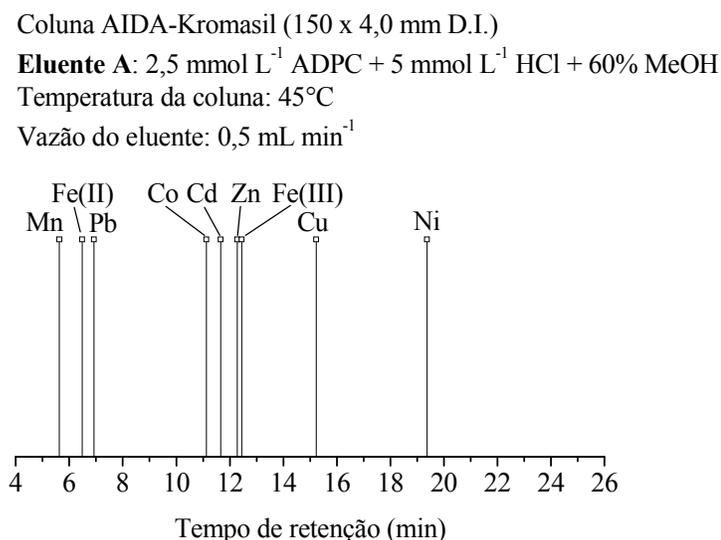


Figura 43. Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse – Eluente A.

O principal problema observado no diagrama de seletividade obtido para os nove constituintes metálicos avaliados foi a possibilidade de interferência do zinco sobre o ferro(III) nas condições especificadas.

Diante disso, considerando os efeitos da acidez do meio, previamente investigados, sobre a retenção dos analitos, a eficiência da separação e a qualidade dos picos, cujos resultados se mostraram mais adequados com o emprego das concentrações de 5 e 10 mmol L⁻¹ de HCl, um novo sistema de eluição foi testado com o incremento de 5 mmol L⁻¹ de HCl a fim de avaliar o seu efeito sobre a seletividade dos nove íons metálicos. O resultado desse teste é apresentado no diagrama da Figura 44.

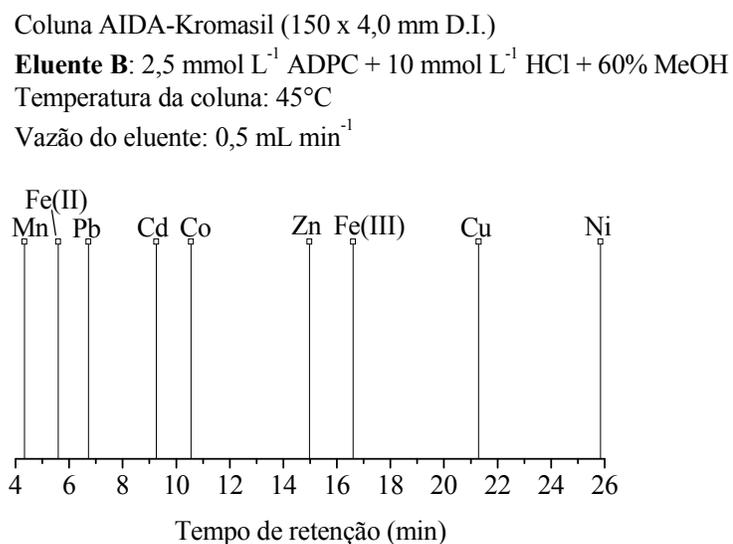


Figura 44. Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse – Eluente B.

De acordo com o diagrama apresentado na Figura 44, o incremento de 5 mmol L⁻¹ de HCl na fase móvel proporcionou uma melhora significativa na seletividade de todos os íons avaliados.

Portanto, as condições finais otimizadas para a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre, livres da interferência de manganês, chumbo, cádmio, cobalto, zinco e níquel, são aquelas descritas no diagrama da Figura 44.

Todos os ensaios descritos anteriormente foram efetuados com a coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Após o estabelecimento das condições ótimas de análise, mais duas colunas cromatográficas foram testadas nas mesmas condições previamente otimizadas, sendo ambas do tipo AIDA-Nucleosil com diferentes comprimentos (10 e 15 cm), conforme descrito na Tabela 6.

Os cromatogramas obtidos para cada coluna cromatográfica, nas mesmas condições experimentais, são ilustrados nas Figuras 45, 46 e 47.

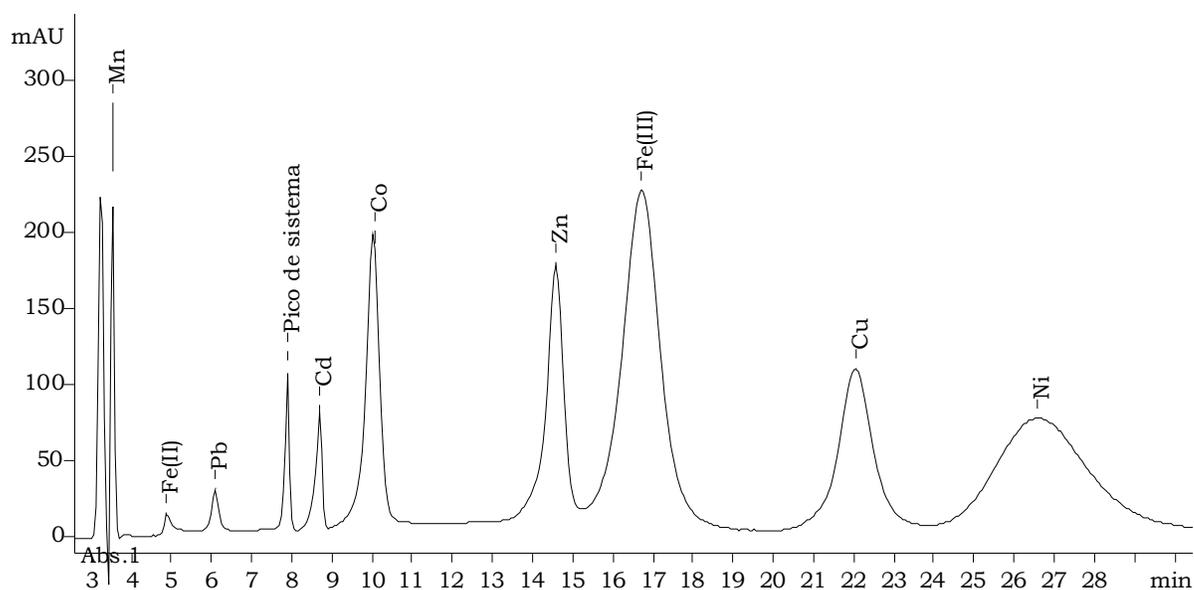


Figura 45. Cromatograma ilustrando a separação de nove constituintes metálicos nas condições experimentais previamente otimizadas, descritas no diagrama da Figura 44. Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 2 de Pb, 1 de Cd, 1 de Co, 1 de Zn, 1 de Fe(III), 2 de Cu e 5 de Ni.

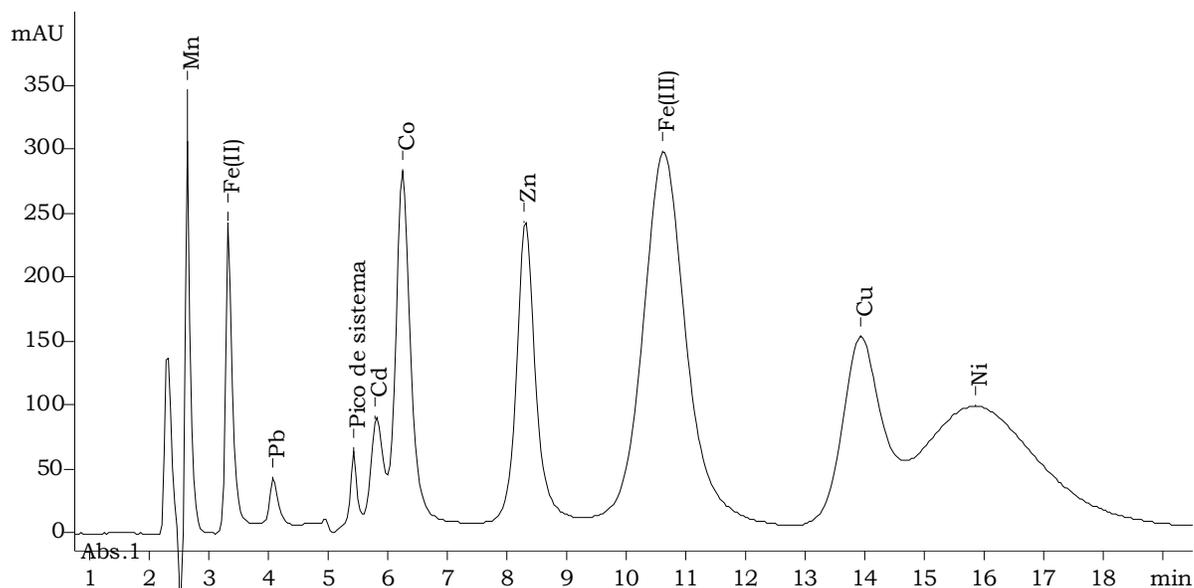


Figura 46. Cromatograma ilustrando a separação de nove constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 45.

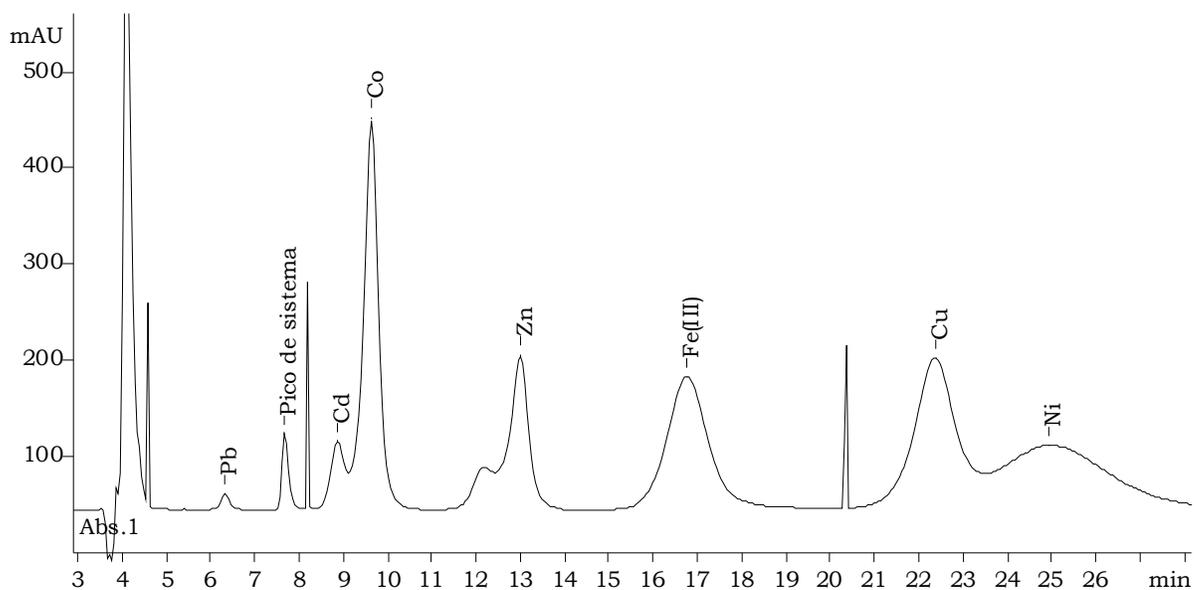


Figura 47. Cromatograma ilustrando a separação de sete constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 5 de Pb, 2 de Cd, 1 de Co, 1 de Zn, 1 de Fe(III), 2 de Cu e 4 de Ni. Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 45. Os picos artefatos que aparecem nos intervalos entre 4-5, 8-9 e 20-21 minutos se referem à passagem de bolhas pelo detector.

Todas as colunas testadas apresentaram a mesma ordem de retenção. Entretanto, a análise dos cromatogramas apresentados sugere que a coluna AIDA-Kromasil foi a que proporcionou a melhor seletividade da separação. A resolução entre os picos de cobre e níquel parece ser determinada pelo tipo de sílica e não pelo comprimento da coluna, considerando que a pressão monitorada no sistema cromatográfico foi diferente para os dois tipos de material (Kromasil em torno de 4,3 MPa e Nucleosil em torno de 6,7 MPa), embora o diâmetro médio de suas partículas seja o mesmo. O manganês é fracamente retido, sendo eluído muito próximo ao volume morto e, por isso, não foi observado na Figura 47.

Nos ensaios referentes aos cromatogramas das Figuras 45 e 46, as soluções padrão utilizadas continham a mesma concentração de todos os elementos. Entretanto, o ferro(II) apresentou um pico muito mais intenso para a análise feita com a coluna AIDA-Nucleosil de 10 cm. Isto pode ser explicado pelo fato deste cátion ser relativamente instável, conforme ilustrado inicialmente na Figura 19. Por isso, o experimento realizado posteriormente, referente ao cromatograma da Figura 47, não incluiu a determinação do íon ferro(II).

Diante do exposto, o sistema ADPC, desenvolvido para a separação cromatográfica de ferro e cobre em matriz etanólica, pode ser empregado satisfatoriamente para identificar e quantificar estes elementos, embora a especiação do primeiro tenha se mostrado inviável devido ao processo de oxidação contínua do ferro(II).

V.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após a etapa de otimização univariada dos ensaios para a separação cromatográfica de ferro e cobre em etanol, diversos experimentos foram efetuados visando estabelecer os principais parâmetros analíticos para a validação da metodologia desenvolvida. Adicionalmente, o zinco foi incluído nesta etapa do trabalho a fim de avaliar seus parâmetros analíticos, já que este metal foi observado em níveis traço em algumas amostras analisadas. Entre as espécies de ferro, somente aquela de maior valência foi considerada pelos motivos já justificados. Os resultados são apresentados na Tabela 14. As Figuras 48, 49 e 50 ilustram as curvas analíticas obtidas para os íons zinco, ferro(III) e cobre, respectivamente.

Tabela 14. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons metálicos em meio etanólico – Sistema ADPC.

Parâmetro	Analito		
	Zinco	Ferro(III)	Cobre
Sensibilidade (mUA s L μmol^{-1})	340,9	436,5	290,4
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,01-10	0,03-10	0,03-10
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9957	0,9996	0,9965
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,002	0,009	0,007
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,007	0,030	0,025
Precisão (%DPR)	3,6	3	3,1
Faixa de recuperação (%)	95-105	95-103	96-108

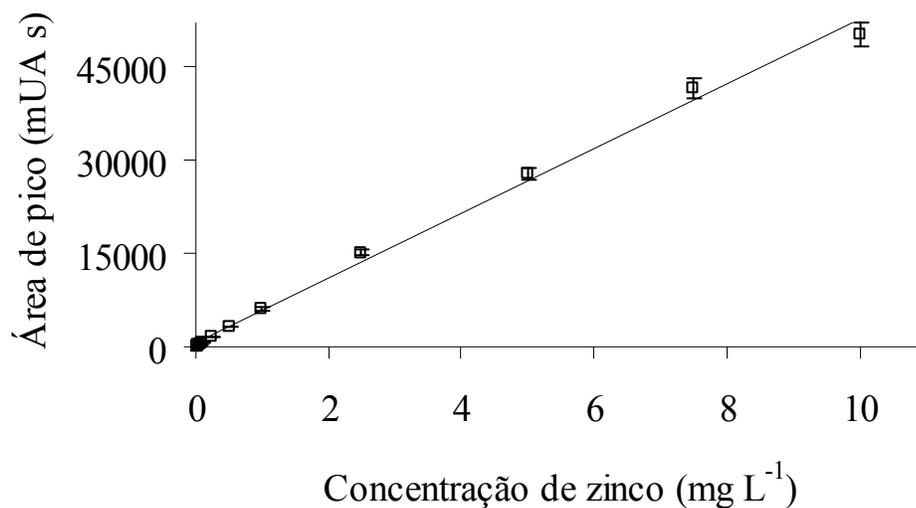


Figura 48. Curva analítica obtida para o zinco nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,01-10 mg L⁻¹ (n = 13) – Sistema ADPC.

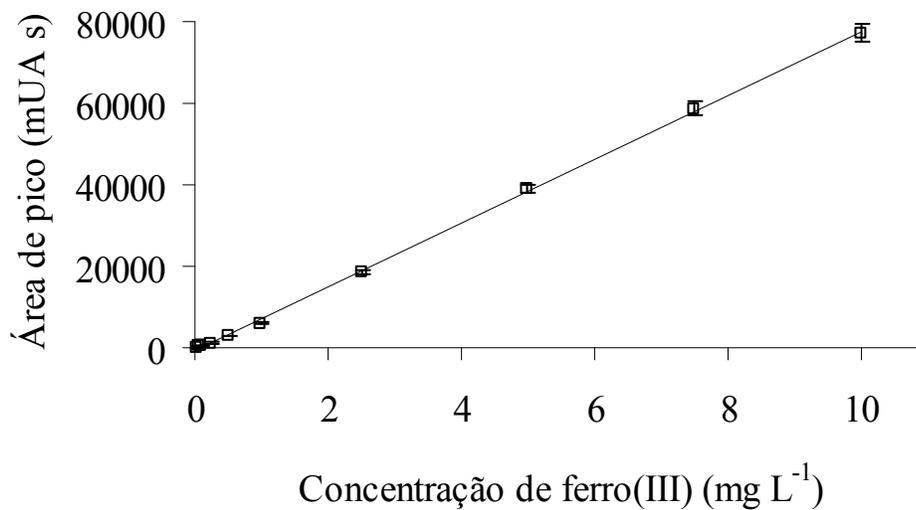


Figura 49. Curva analítica obtida para o ferro(III) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 11) – Sistema ADPC.

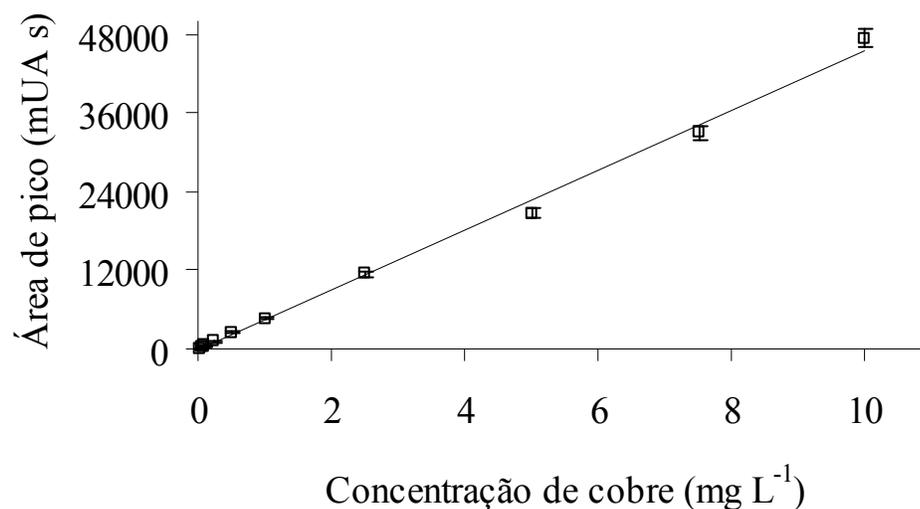


Figura 50. Curva analítica obtida para o cobre nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 11) – Sistema ADPC.

De acordo com os dados da Tabela 14, é possível observar que a sensibilidade analítica encontrada para o ferro(III) é aproximadamente 1,5 vezes maior em relação àquela obtida para o cobre. De maneira geral, os três metais avaliados apresentaram uma ampla faixa linear de resposta com alta precisão e exatidão satisfatória. Os limites de detecção e quantificação foram alcançados em níveis da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo, em geral, mais altos que aqueles obtidos pelos métodos espectroscópicos ou eletroquímicos descritos na literatura para a mesma finalidade, de acordo com a Tabela 4, porém, são compatíveis com os resultados obtidos por Teixeira *et al.*¹¹¹, que também empregaram a técnica de detecção fotométrica para a determinação de cobre e ferro em etanol combustível, embora tenham utilizado diferentes reagentes derivados da ferroína e pré-concentrado as amostras.

Finalmente, diversas amostras de álcool combustível hidratado (AEHC) foram analisadas para demonstrar a aplicabilidade do método aqui proposto. De maneira geral, os metais encontrados nas amostras testadas foram o zinco e o cobre, ambos em níveis pouco acima de seus limites de detecção. Para exemplificar, a Figura 51 ilustra o resultado da análise da amostra A com a coluna AIDA-Kromasil, enquanto a Figura 52 apresenta outro cromatograma obtido para a mesma amostra, mas usando a coluna AIDA-Nucleosil de 10 cm. Os resultados corroboram entre si, confirmando a presença de zinco e cobre na amostra analisada em níveis traço.

As concentrações indicadas nas legendas são estimativas, tendo sido calculadas com base no ensaio efetuado posteriormente com a amostra B (isenta de metais), por adição de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada íon, usando a coluna AIDA-Nucleosil de 15 cm. O cromatograma resultante deste ensaio é mostrado na Figura 53.

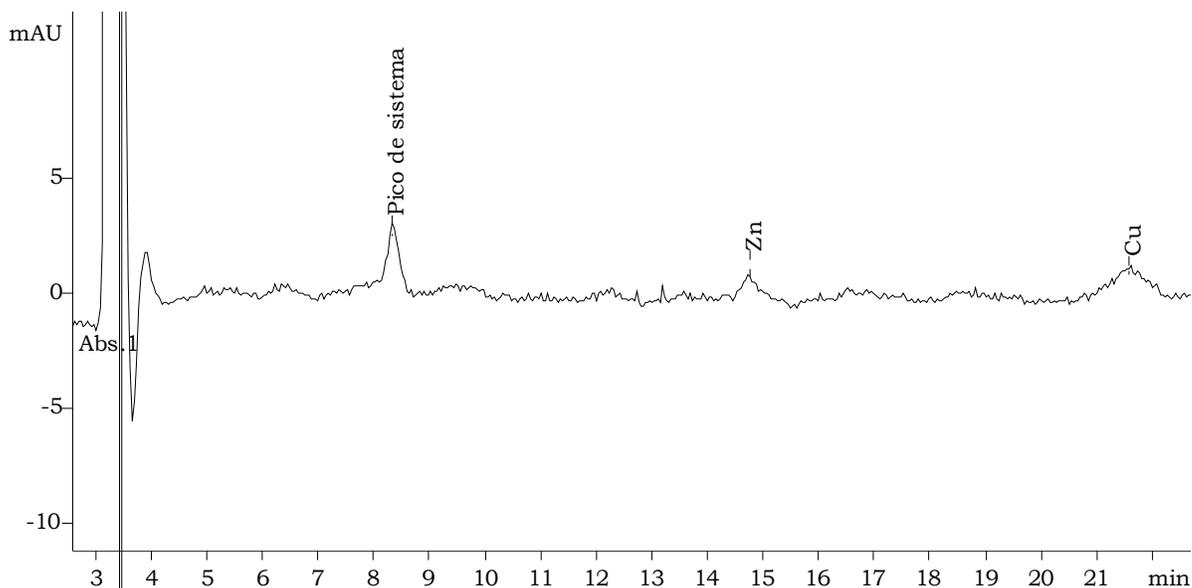


Figura 51. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Concentrações estimadas para cada analito, em $\mu\text{g L}^{-1}$: 2,8 de zinco e 14 de cobre.

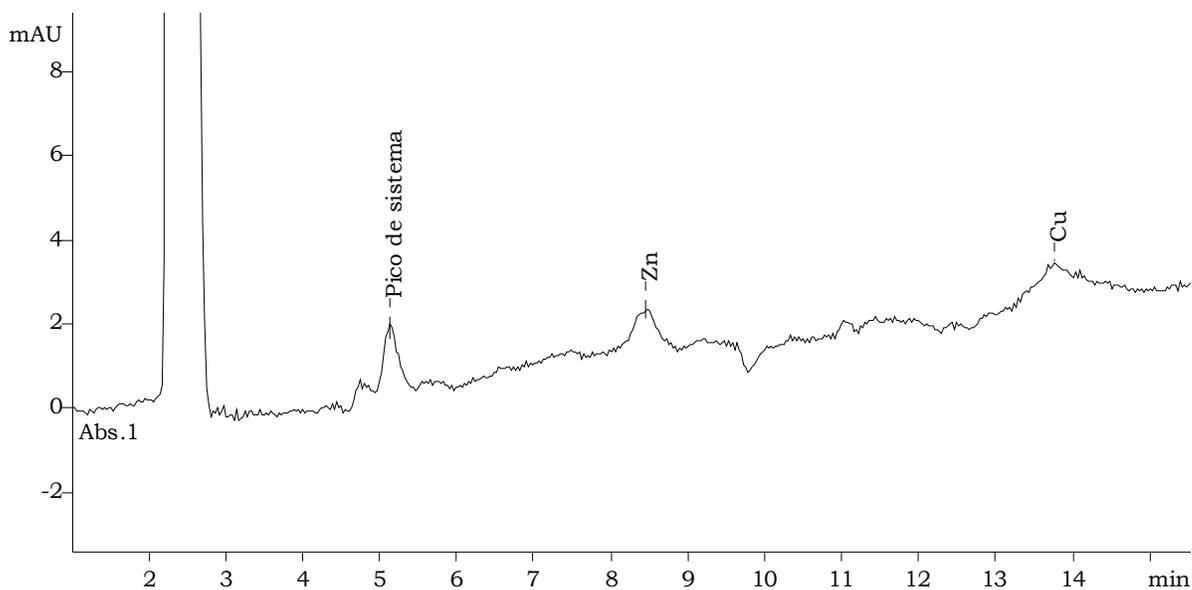


Figura 52. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos presentes em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Concentrações estimadas para cada analito, em $\mu\text{g L}^{-1}$: 2,8 de zinco e 9,1 de cobre.

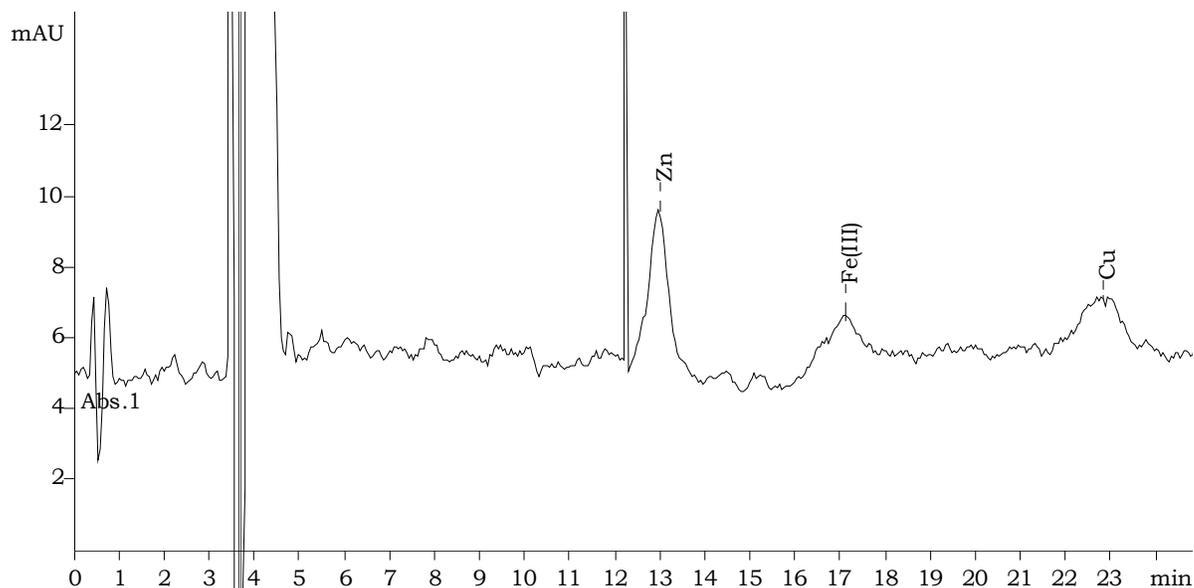


Figura 53. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos adicionados ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada) em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra B – nas condições previamente otimizadas – Sistema ADPC. Coluna AIDA-Nucleosil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$). Volume de injeção de $100 \mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. O pico artefato que aparece próximo de 12 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector.

Portanto, o método desenvolvido para o sistema ADPC se mostrou adequado para a separação e quantificação de ferro e cobre em bioetanol de acordo com as normas vigentes, descritas na Tabela 2, que estabelecem limites de 5 mg kg^{-1} para o ferro e a partir de $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ para o cobre. Além disso, de maneira geral, suas principais vantagens em relação aos métodos já existentes são a possibilidade de injeção direta de amostra, sem a necessidade de pré-tratamento, e a seletividade para, pelo menos, nove íons metálicos, incluindo a especiação de ferro, embora a espécie de menor valência possa ser somente identificada.

CAPÍTULO VI

Resultados e Discussão

Íons Metálicos - Sistema AQLD

VI.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

VI.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O ácido quelidâmico (AQLD) forma, em geral, complexos mais estáveis com metais polivalentes em relação ao ácido dipicolínico (ADPC), conforme pode ser observado pela análise da ordem de grandeza das constantes de estabilidade discriminadas na Tabela 9. A escala é logarítmica, logo, a razão absoluta é elevada. Por exemplo, na razão 1:1 (metal:ligante) o AQLD forma um complexo com o íon Mn(II) cerca de 49 vezes mais estável que aquele formado com o ADPC.

Existem poucos estudos divulgados na literatura sobre as propriedades e aplicações do AQLD, em torno de 60 trabalhos somente (base de dados ISI Web of KnowledgeSM), sendo que mais da metade foram publicados na última década, sobretudo na área de química de coordenação. Apenas uma aplicação analítica foi encontrada, um trabalho de 1962 descrevendo a determinação fotométrica de ferro¹⁸⁹. Por essa razão, não foi possível encontrar os valores das constantes de estabilidade para os complexos de Fe(II), Fe(III), Cd e Pb com este agente quelante.

Neste trabalho, o AQLD foi avaliado como um novo agente quelante para aplicação em CLQI, sendo também o seu primeiro relato em sistemas cromatográficos de maneira geral.

Outras considerações a respeito dos princípios básicos da técnica de CLQI podem ser vistas no subcapítulo V.1.1.

As estruturas dos complexos metálicos do AQLD são ilustradas na Figura 54.

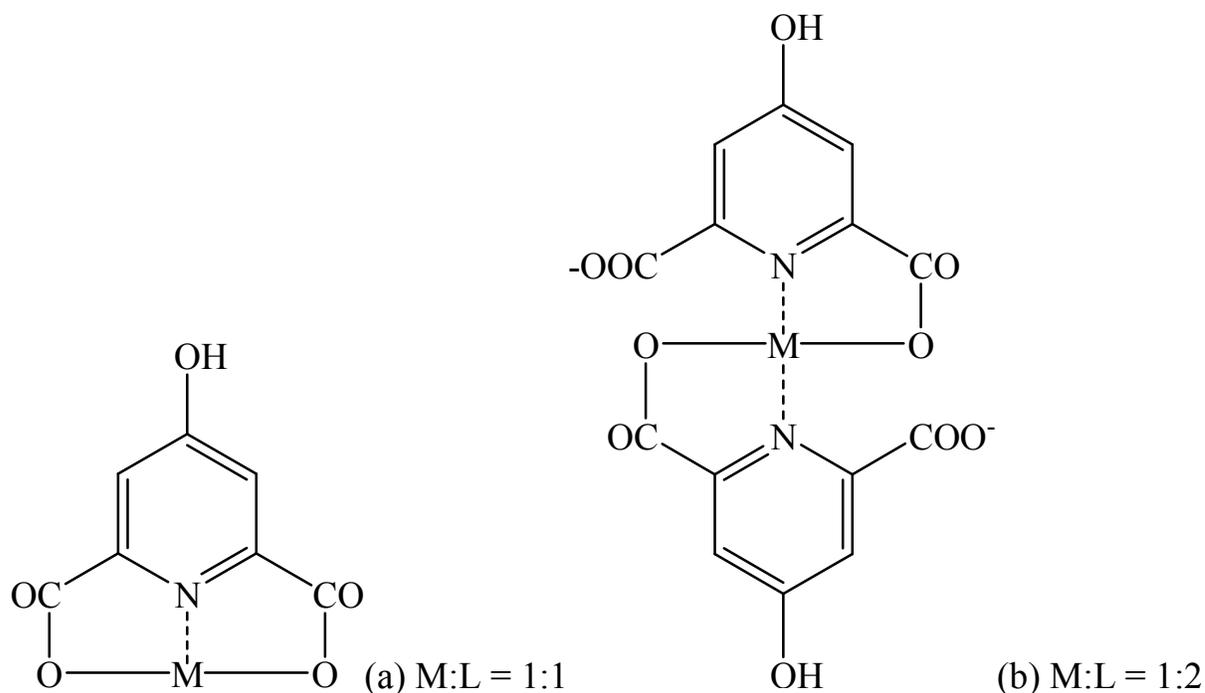


Figura 54. Estruturas dos complexos metálicos do ácido quelidâmico (AQLD). As razões metal:ligante (M:L) são indicadas em cada ilustração.

A partir do próximo item são apresentados os resultados referentes ao processo de otimização univariada da separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre para o sistema AQLD.

VI.1.2 EFEITO DA ACIDEZ DO MEIO – ELUENTE SEM TEA

Com base no estudo anterior realizado para o ADPC, a concentração e o pH do sistema de eluição à base de AQLD foram escolhidos para os testes iniciais de otimização da separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre.

A principal limitação encontrada para o emprego do AQLD como eluente complexante foi a sua baixa solubilidade em meio ácido. Por isso, diversas tentativas foram feitas para tentar contornar essa situação.

Inicialmente, tentou-se preparar uma solução estoque de AQLD a 10 mmol L^{-1} , porém, devido à sua baixa solubilidade em meio ácido, essa concentração foi reduzida para 4 mmol L^{-1} . Desta forma, através da adição de LiOH, a uma concentração de aproximadamente $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, foi possível preparar uma solução a 4 mmol L^{-1} de AQLD em pH 2,5. Contudo, os resultados obtidos através da separação cromatográfica nestas condições não foram satisfatórios, tendo em vista que o tempo de retenção obtido para o ferro(II) foi muito elevado e os íons ferro(III) e cobre foram eluídos juntos. O cromatograma obtido para essa análise é mostrado na Figura 55.

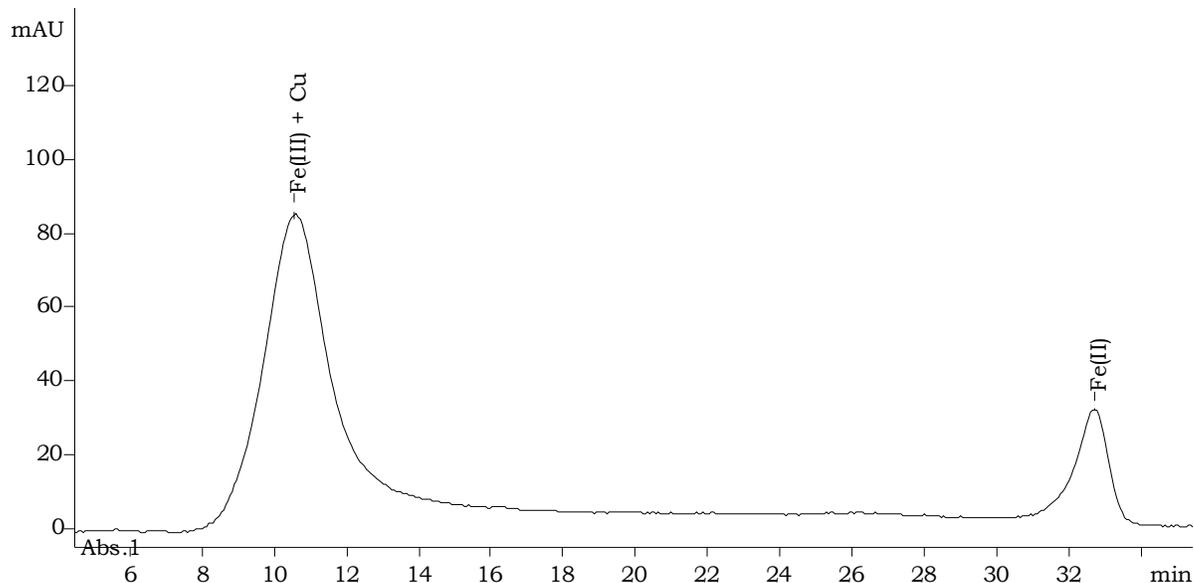


Figura 55. Cromatograma ilustrando o primeiro ensaio realizado com o sistema AQLD para a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Coluna AIDA-Kromasil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$), mantida à temperatura ambiente (aprox. 25°C). Eluente composto por uma solução de AQLD a 4 mmol L^{-1} em pH 2,5, sob eluição isocrática a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. Solução padrão multielementar preparada com o próprio eluente contendo aproximadamente $6,7 \text{ mg L}^{-1}$ de cada elemento.

Diante dos problemas observados no experimento anterior, foi avaliada a possibilidade de redução do pH do meio sem alterar a concentração e a solubilidade do reagente. Para isso, uma nova solução eluente foi preparada, desta vez sob aquecimento a 90°C durante aproximadamente 40 minutos com agitação magnética. Desta forma, foi possível obter a completa solubilização do AQLD em solução aquosa sem a necessidade de adição de LiOH. Assim, uma solução a 4 mmol L⁻¹ de AQLD foi preparada com o pH ajustado para 2 através da adição de aproximadamente 3 mmol L⁻¹ de HCl. O cromatograma obtido para o ensaio realizado com esse segundo eluente é apresentado na Figura 56.

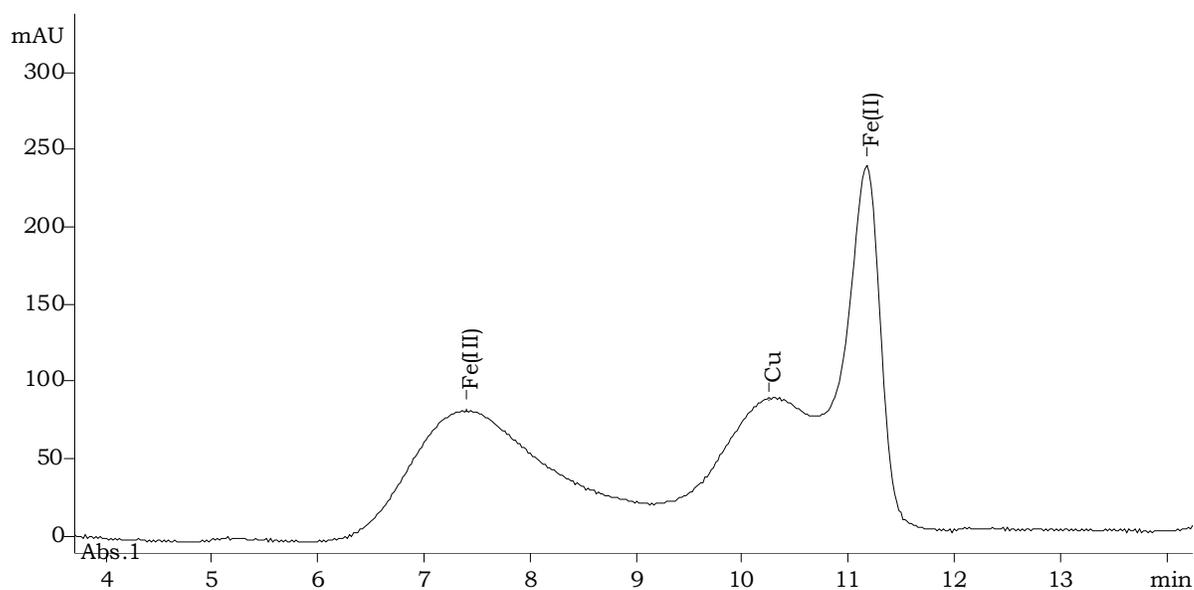


Figura 56. Cromatograma ilustrando o segundo ensaio realizado com o sistema AQLD para a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais empregadas no primeiro ensaio, mas desta vez o pH do eluente foi reduzido para 2.

A separação cromatográfica obtida nestas condições foi visualmente melhor que no primeiro caso. Isto mostra o forte efeito do pH do eluente sobre a retenção dos íons selecionados, sobretudo para o ferro(II), que apresentou uma redução de aproximadamente 20 minutos no tempo de retenção. Entretanto, no dia seguinte após o preparo deste segundo eluente, foi observada a formação de pequenos cristais na parede do frasco e o pH da solução apresentou um aumento de aproximadamente 0,25 unidades, diferentemente do primeiro eluente com pH 2,5, que se mostrou estável ao longo do tempo. Isto demonstra que o segundo eluente se mostrou instável devido à sua tendência de recristalização com o aumento da acidez do meio, sugerindo que o pH deve ser mantido em valores a partir de aproximadamente 2,3 para que não ocorra a recristalização do AQLD.

Com base nos problemas decorrentes da dissolução do AQLD em meio ácido e na necessidade de se trabalhar em condições de pH em torno de 2, a solubilidade deste composto foi testada na presença de diversos solventes orgânicos, tais como, metanol, etanol, n-propanol, acetonitrila e acetona. Entre estes, o metanol se mostrou mais eficiente, com uma solubilidade de aproximadamente 170 mg de AQLD (ou 0,93 mmol) para cada 100 mL de solvente.

Diante do exposto, visando melhorar a solubilidade do AQLD em meio ácido, reduzir custos e aumentar a resolução entre os picos, a concentração deste composto foi reduzida pela metade e foram acrescentados 30% de metanol, o qual também tem um papel fundamental no eluente devido à matriz orgânica de interesse. Devido a isso, em vez de ajustar o pH do eluente, a acidez do meio foi controlada pela concentração de HCl.

Neste sentido, a otimização da acidez do meio foi realizada através da análise de alguns parâmetros cromatográficos em função do conteúdo de HCl na fase móvel. Para isso, diferentes concentrações de HCl foram testadas, variando entre 5 e 10 mmol L⁻¹, e as concentrações de AQLD e MeOH foram fixadas em 2 mmol L⁻¹ e 30%, respectivamente. Além disso, a temperatura da coluna foi mantida em 30°C e as soluções padrão utilizadas foram preparadas em etanol puro.

Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 57, 58 e 59, que mostram como o tempo de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, de cada íon metálico variam em função da concentração de HCl na fase móvel.

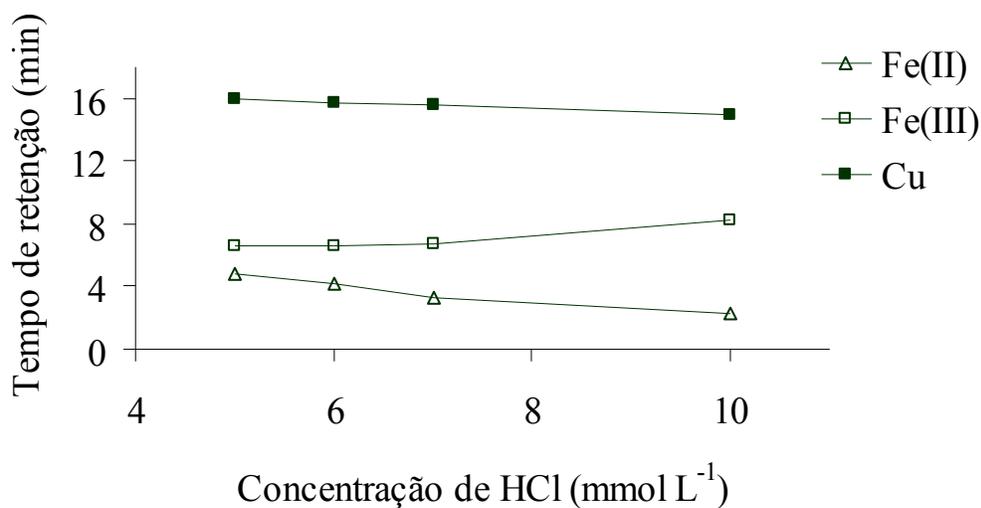


Figura 57. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹ e MeOH a 30%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna.

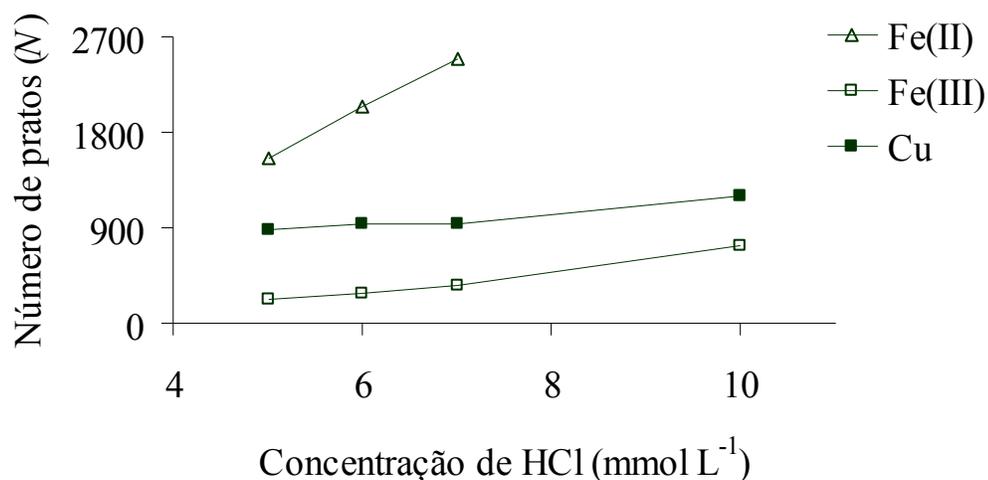


Figura 58. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna.

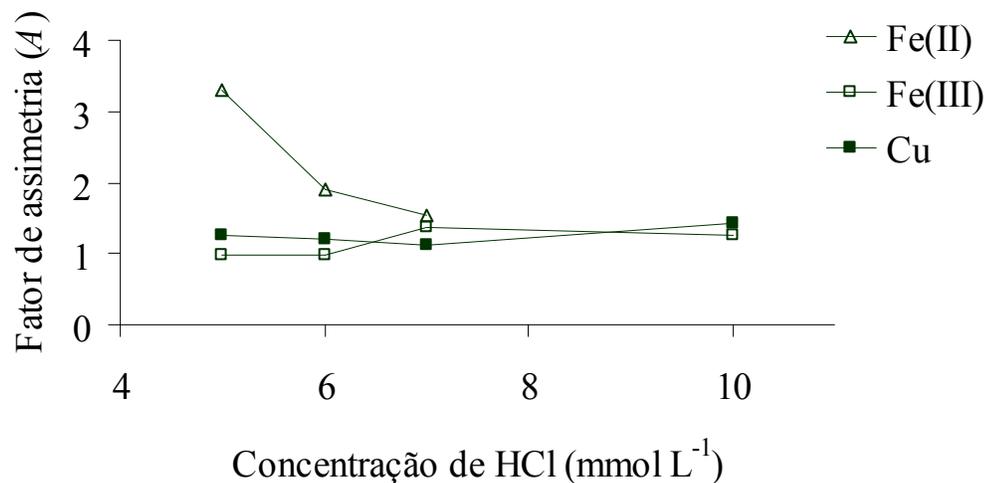


Figura 59. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Com 10 mmol L⁻¹ de HCl no eluente o ferro(II) é eluído no volume morto da coluna.

Analisando o gráfico da Figura 57, é possível observar que a retenção dos íons ferro(II) e cobre diminui com o aumento da acidez do meio, enquanto a retenção do ferro(III) apresenta uma tendência de elevação. Isto sugere a existência de diferentes mecanismos envolvidos no processo de separação cromatográfica.

De forma análoga à interpretação dos resultados obtidos para a etapa de otimização da acidez do meio do sistema de eluição à base de ADPC, descrita previamente, a retenção dos íons metálicos no sistema de eluição à base de AQLD também depende, sobretudo, dos equilíbrios de complexação que ocorrem entre as fases móvel e estacionária, sendo governados pelas constantes de estabilidade dos complexos formados. Entretanto, isto só ocorre de forma predominante em condições de pH constante, considerando que a variação da acidez do meio vai influenciar no grau de dissociação dos ácidos orgânicos constituintes das fases móvel e estacionária e, portanto, nos equilíbrios de troca iônica, governados por interações eletrostáticas. No caso do ferro(II), por exemplo, possivelmente o mecanismo de separação prevaiente envolve o processo de troca iônica, considerando que o aumento da concentração de H^+ no eluente tende a enfraquecer os quelatos mais sensíveis à acidez do meio e, desta forma, acelerar a eluição. Em menor grau, este mesmo efeito parece ocorrer com o cobre, embora sua retenção seja relativamente elevada. Por outro lado, o equilíbrio de complexação parece ser predominante no processo de separação do ferro(III).

A eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 58, apresentou uma tendência geral de aumento com a acidez do meio para os três íons. O fator de assimetria para o pico do ferro(II) também melhorou com o aumento da acidez do meio, enquanto que os picos de ferro(III) e cobre foram mais simétricos em condições menos ácidas (Figura 59).

Considerando que o ferro(II) foi eluído no volume morto da coluna quando o eluente continha HCl na concentração de 10 mmol L^{-1} , o seu número de pratos não foi calculado, nem o seu fator de assimetria. O cromatograma referente a esse ensaio é mostrado na Figura 60.

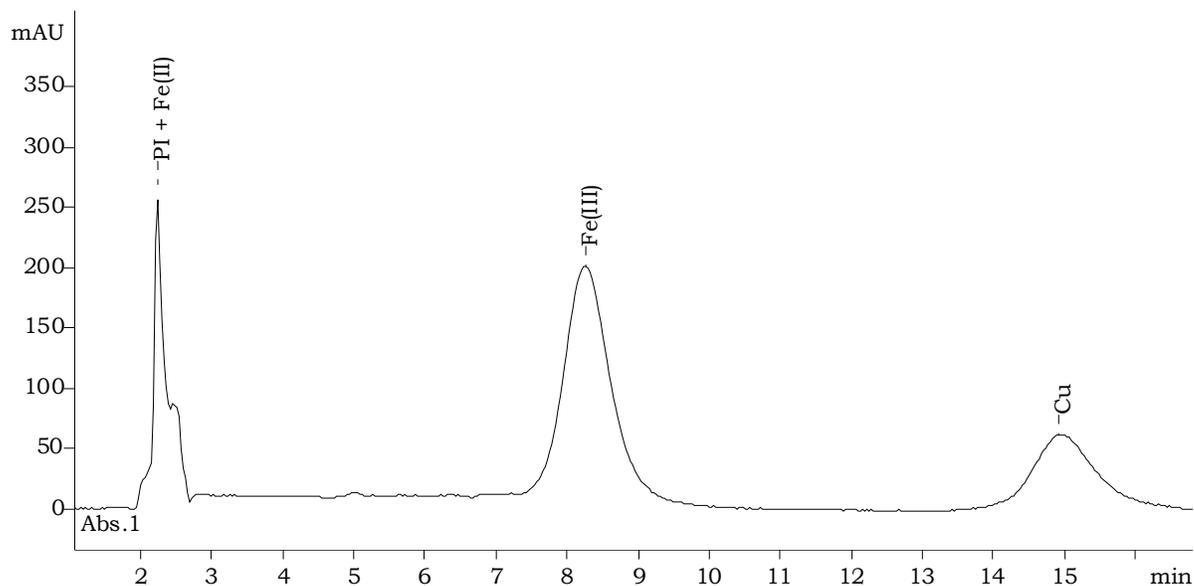


Figura 60. Cromatograma ilustrando a eluição do ferro(II) no volume morto da coluna quando a concentração de HCl de 10 mmol L^{-1} foi testada no eluente. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. PI representa o pico de injeção, referente à matriz etanólica.

Diante do exposto, com base na interpretação dos parâmetros cromatográficos avaliados, os melhores resultados foram obtidos através da adição de 7 mmol L^{-1} de HCl no eluente. Posteriormente, a influência de outros metais foi investigada nestas condições. O cromatograma referente ao ensaio realizado é apresentado na Figura 61.

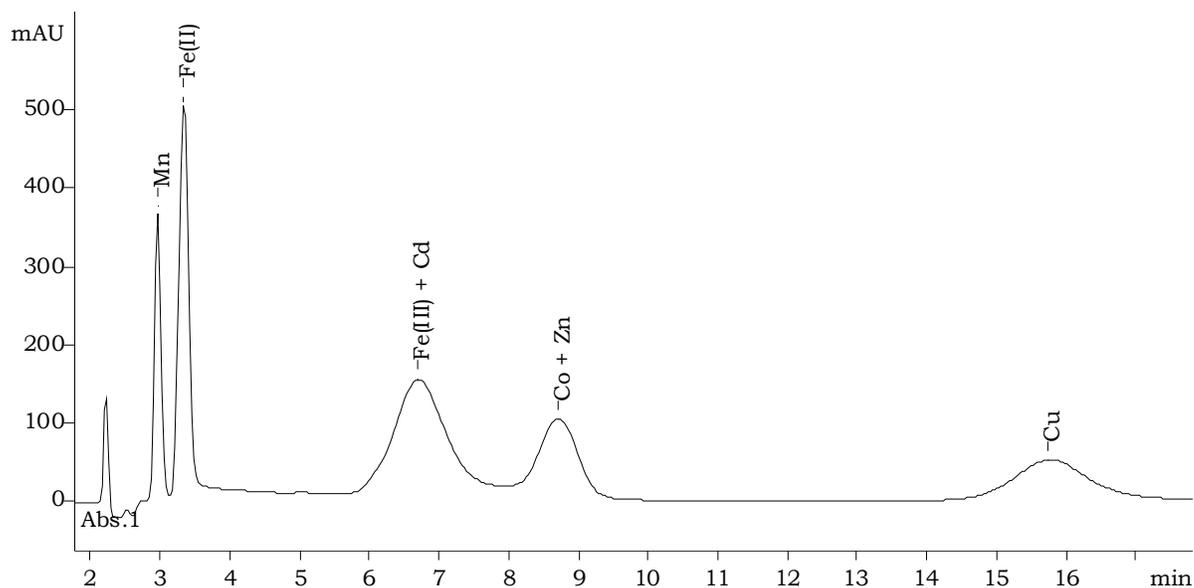


Figura 61. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre juntamente com outros elementos na mesma concentração. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 57. Eluente contendo HCl na concentração de 7 mmol L^{-1} . Pb e Ni não foram identificados nestas condições.

Conforme se observa no cromatograma da Figura 61, embora a seletividade para os três analitos tenha se mostrado adequada para os procedimentos subsequentes, a presença de cádmio pode interferir na determinação do ferro(III) nas condições de análise supracitadas.

Todos os ensaios descritos até agora para a otimização da acidez da fase móvel contendo 30% de metanol foram efetuados com a mesma solução eluente em aproximadamente dois dias. Entretanto, no final das análises foi observada novamente a formação de cristais na parede do frasco, indicando a recristalização parcial do AQLD na solução, possivelmente até atingir o valor do pH que limita a sua solubilidade. A velocidade desse processo não foi determinada e, por isso, não foi possível avaliar o seu efeito sobre os experimentos realizados.

Portanto, embora uma quantidade de metanol suficiente para dissolver completamente o AQLD tenha sido empregada, a acidez do meio pareceu ser o fator determinante para a sua solubilidade. Neste sentido, o sistema de eluição avaliado não se mostrou adequado para aplicações práticas, tendo em vista que a sua instabilidade, devido ao processo de recristalização, pode afetar o desempenho analítico do método, além de causar danos no sistema cromatográfico.

VI.1.3 EFEITO DA ACIDEZ DO MEIO – ELUENTE COM TEA

Diante dos problemas expostos anteriormente, a possibilidade de adição de um outro componente ao eluente foi investigada a fim de eliminar ou minimizar o processo de recristalização do AQLD no meio. Para isso, diversos compostos orgânicos de caráter básico, pertencentes à classe das aminas, foram testados, tais como, trietanolamina ($pK_a = 7,8$), dietanolamina ($pK_a = 8,9$), metilamina ($pK_a = 10,6$), dietilamina ($pK_a = 10,8$) e n-butilamina ($pK_a = 12,5$).

Os testes preliminares de solubilidade foram efetuados através da adição gradativa de microvolumes de cada amina em diferentes tubos de ensaio contendo em torno de 5 mg de AQLD cada. Os resultados observados indicaram nitidamente que o AQLD foi rapidamente solubilizado na presença de trietanolamina, dietanolamina e metilamina e, em menor grau, na presença de dietilamina e n-butilamina.

Portanto, com base nos valores das constantes de dissociação (pK_a) das aminas que apresentaram os melhores resultados de solubilidade, a trietanolamina (TEA) foi escolhida para os ensaios seguintes. Assim, um estudo mais preciso foi efetuado com a finalidade de determinar a solubilidade do AQLD em solução de TEA. Com isso, a razão molar encontrada foi de aproximadamente 4:3

(TEA:AQLD). Por isso, visando assegurar a solubilização total do AQLD, uma razão molar de 3:2 (TEA:AQLD) foi usada em todos os procedimentos subsequentes. Deste modo, foi possível preparar uma solução estoque de eluente em uma concentração mais elevada, mantendo a razão molar constante.

A partir de então, a composição da fase móvel foi alterada pela adição de 3 mmol L⁻¹ de TEA. Portanto, o efeito da acidez do meio, avaliado através da variação da concentração de HCl, foi realizado novamente para o sistema AQLD.

Devido à presença de TEA no eluente, o pH da solução se tornou mais elevado e, por isso, foi necessário um incremento de HCl para que a retenção do ferro(II) pudesse ser adequada, considerando que este íon se mostrou mais sensível que os outros em relação à acidez do meio, de acordo com os resultados prévios. Portanto, a concentração máxima testada de HCl foi de 12 mmol L⁻¹, a fim de evitar novamente a recristalização parcial do AQLD em solução, mesmo na presença de metanol e TEA.

Os gráficos apresentados a seguir nas Figuras 62, 63 e 64 ilustram os resultados dos diferentes parâmetros cromatográficos obtidos na etapa de otimização da acidez do meio na presença de TEA. As concentrações de HCl variaram entre 7 e 12 mmol L⁻¹, e os conteúdos de AQLD, TEA e MeOH foram fixados em 2 e 3 mmol L⁻¹ e 30%, respectivamente. Além disso, a temperatura da coluna foi mantida em 30°C e as soluções padrão utilizadas foram preparadas em etanol puro.

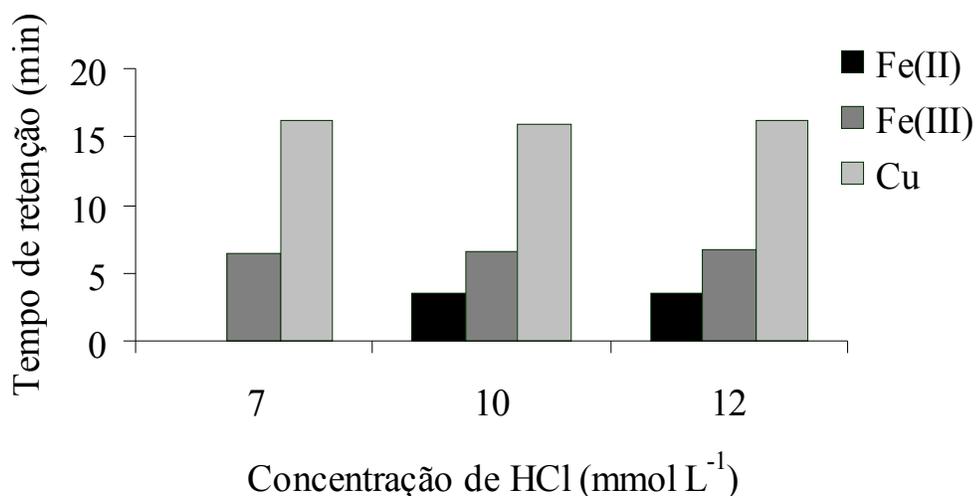


Figura 62. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹ e MeOH a 30%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 20 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 6,7 mg L⁻¹ de cada elemento.

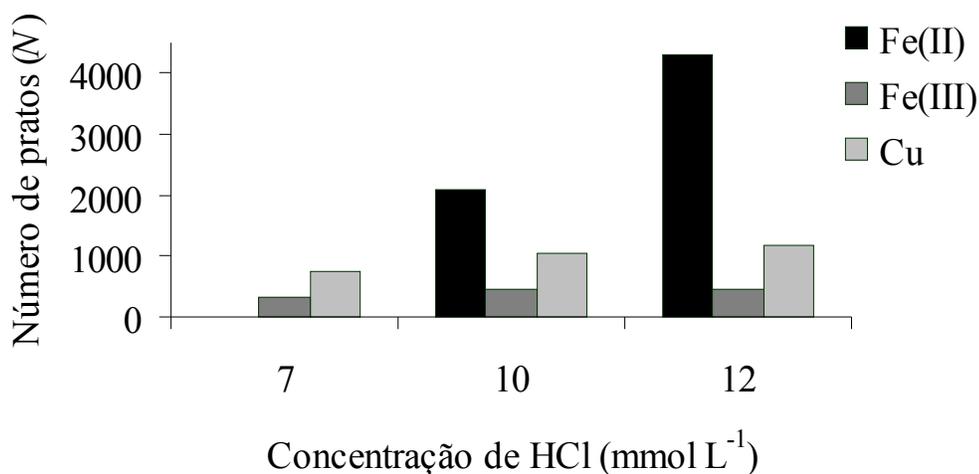


Figura 63. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62.

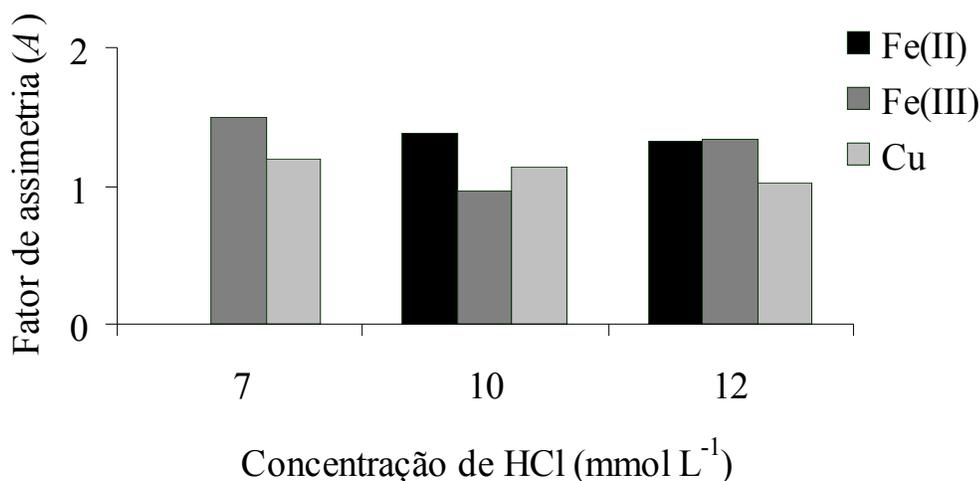


Figura 64. Efeito da concentração de ácido clorídrico sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62.

Conforme já era esperado, o emprego de TEA no eluente alterou o pH da solução afetando diretamente a retenção do ferro(II), que só foi observada nas condições mais ácidas testadas, de acordo com a Figura 62. Novamente, isto sugere um mecanismo de separação diferenciado para o íon ferro(II) em relação aos demais. A retenção dos outros íons metálicos não foi influenciada pela variação da concentração de HCl e, aparentemente, a simetria dos picos (Figura 64) também não. Por outro lado, a eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 63, apresentou uma tendência geral de aumento com a acidez do meio para os três íons, sobretudo para o ferro(II).

Diante dos resultados obtidos, a concentração de HCl de 12 mmol L⁻¹ foi a que proporcionou o melhor desempenho cromatográfico, especialmente para o ferro(II). Posteriormente, a influência de outros metais foi investigada nestas condições. O cromatograma referente ao ensaio realizado é apresentado na Figura 65.

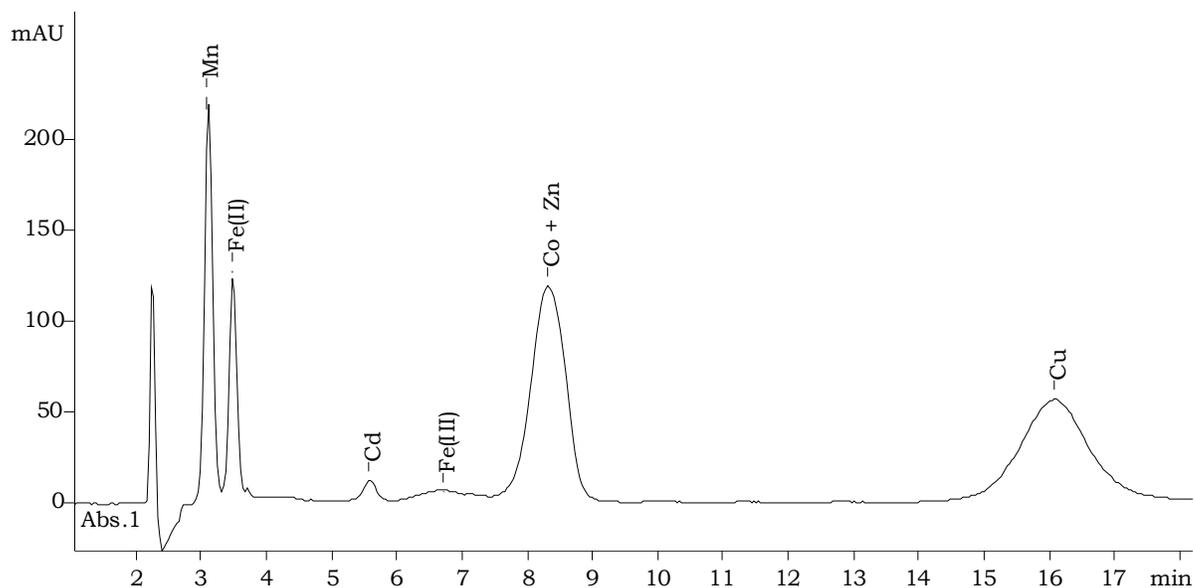


Figura 65. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre juntamente com outros elementos na mesma concentração. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 62. Eluente contendo HCl na concentração de 12 mmol L^{-1} . Pb e Ni não foram identificados nestas condições.

Comparando o cromatograma ilustrado na Figura 65 com aquele da Figura 61, é possível observar que a retenção dos analitos permaneceu praticamente constante, exceto para o cádmio, que teve uma redução de aproximadamente 1 minuto em seu tempo de retenção, eliminando, desta forma, a sua interferência sobre o ferro(III), cuja eficiência cromatográfica se mostrou insatisfatória devido à baixa intensidade de seu pico relativamente alargado.

A alteração observada na retenção do cádmio pode ser explicada pelo efeito do íon cloreto sobre este metal. No último caso (Figura 65), o eluente continha 5 mmol L^{-1} de HCl e 3 mmol L^{-1} de TEA. Esse comportamento corrobora com outros trabalhos publicados na literatura^{86,88,89}, onde os autores ressaltam que a retenção do cádmio em CLQI pode ser influenciada pelo íon cloreto de forma mais pronunciada que para outros metais comuns.

VI.1.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MeOH

Embora o emprego de 30% de metanol na fase móvel tenha proporcionado resultados satisfatórios para a seletividade da separação dos íons de interesse, a eficiência cromatográfica para o ferro(III) não se mostrou adequada devido à baixa intensidade e ao perfil de seu pico, conforme discutido anteriormente. Portanto, outros teores de MeOH foram testados com a finalidade de investigar o efeito do modificador orgânico sobre o processo de separação dos analitos.

De forma similar aos ensaios anteriores, a otimização da concentração de MeOH foi executada através da análise de alguns parâmetros cromatográficos em função do conteúdo deste solvente na fase móvel. Para isso, diferentes concentrações de MeOH foram testadas, variando entre 30 e 50%, e as demais condições, previamente otimizadas e descritas no item anterior, foram mantidas constantes.

Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 66, 67 e 68, que mostram como o tempo de retenção, o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, variam em função da concentração de MeOH na fase móvel.

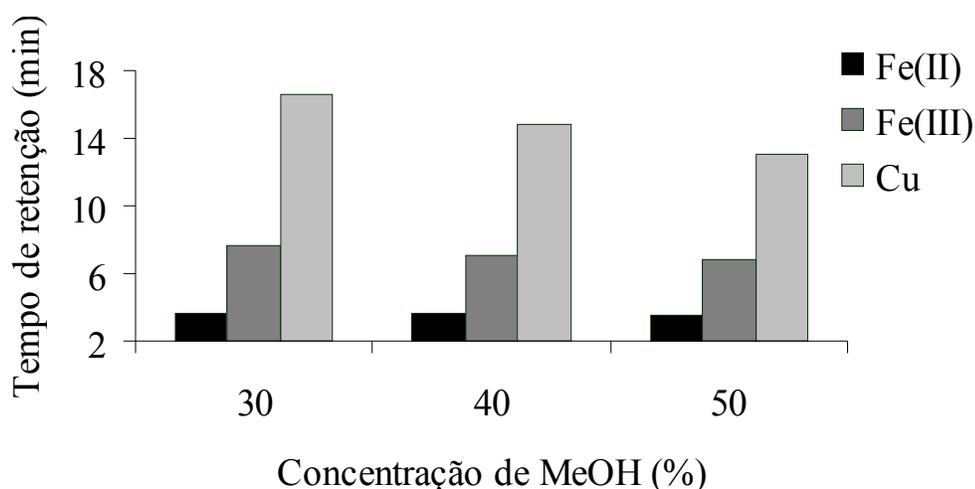


Figura 66. Efeito da concentração de metanol sobre o tempo de retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 30°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹ e HCl a 12 mmol L⁻¹, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento.

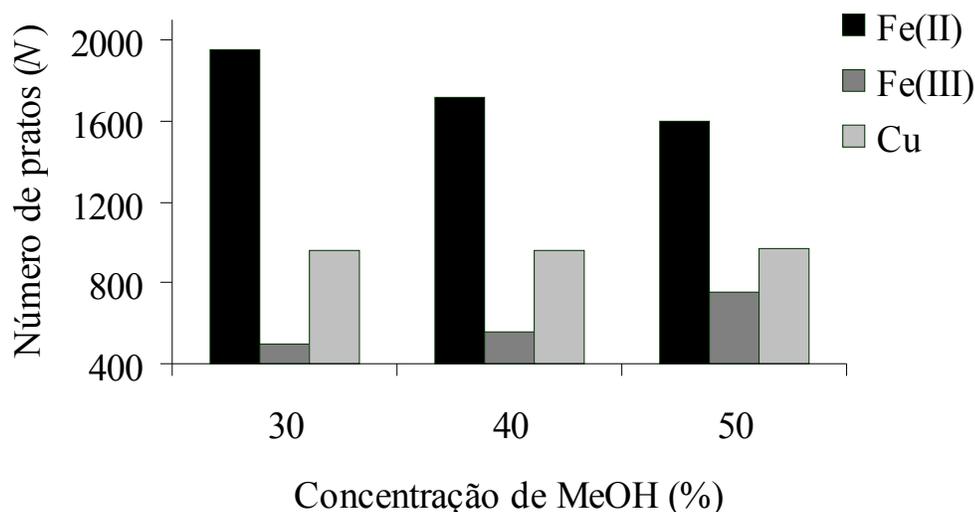


Figura 67. Efeito da concentração de metanol sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66.

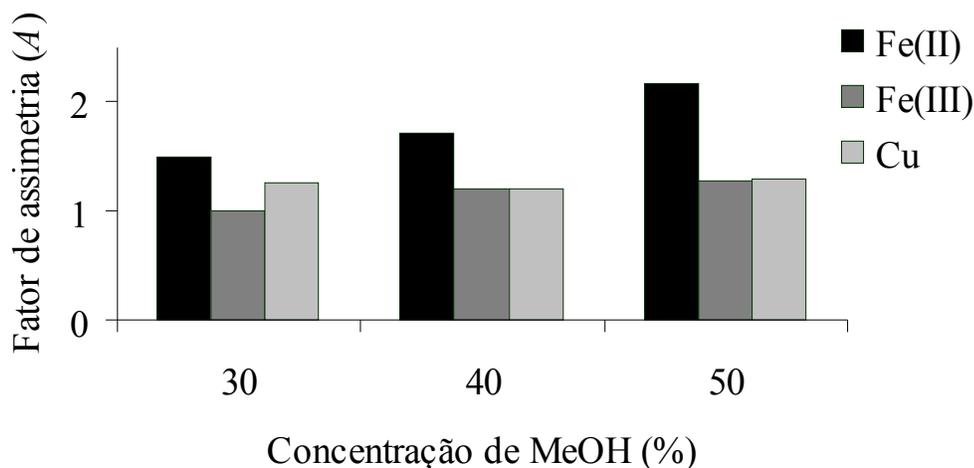


Figura 68. Efeito da concentração de metanol sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66.

Analisando o gráfico da Figura 66, é possível observar que a retenção das espécies de ferro apresentou pouca ou nenhuma alteração em função do teor de MeOH na fase móvel. Por outro lado, o cobre teve uma tendência de redução na retenção como o aumento do conteúdo deste solvente, sugerindo que, em meio orgânico, a cinética do equilíbrio de complexação é favorecida no sentido da formação do quelato do AQLD.

A eficiência cromatográfica, ilustrada no gráfico da Figura 67, apresentou uma tendência crescente para o ferro(III), decrescente para o ferro(II) e praticamente constante para o cobre com o aumento da concentração de MeOH. Por outro lado, a qualidade dos picos se mostrou mais satisfatória para concentração de 30% de MeOH, na qual os valores obtidos para o fator de assimetria se aproximam mais da unidade (Figura 68).

Portanto, com base nos parâmetros cromatográficos avaliados, visando obter uma separação mais eficiente, especialmente para o ferro(III), que, comparativamente, apresentou baixos valores para o número de pratos, o teor de MeOH selecionado para as etapas seguintes foi de 50%. A Figura 69 ilustra a separação dos analitos realizada nestas condições.

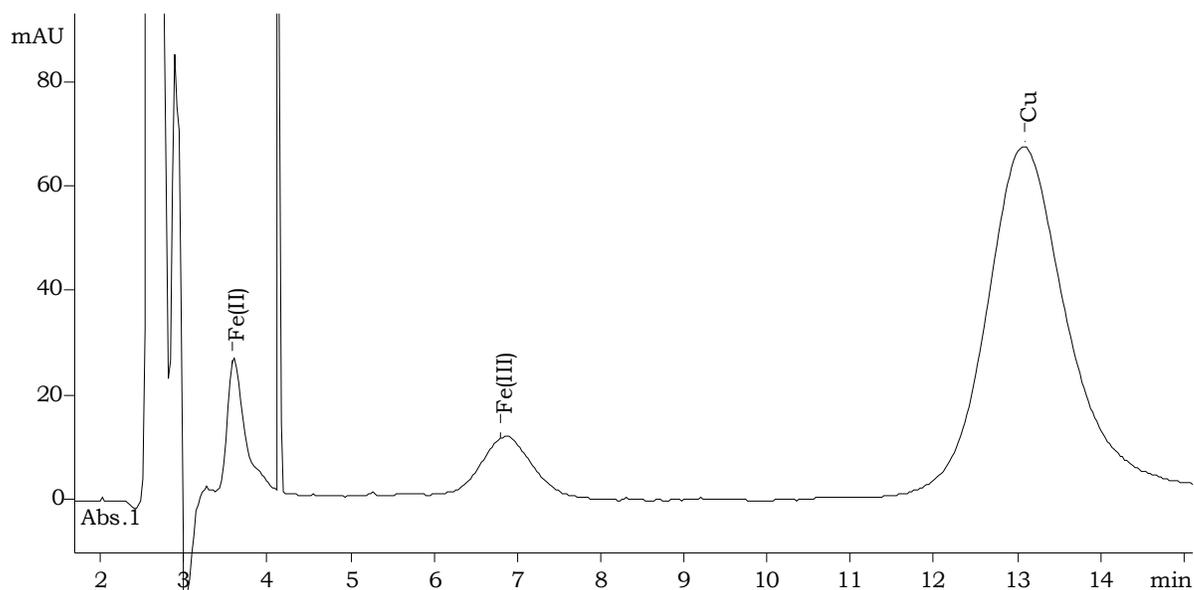


Figura 69. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 66. Eluente contendo 50% de MeOH. O pico artefato que aparece próximo de 4 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector.

VI.1.5 EFEITO DA TEMPERATURA DA COLUNA

A influência da temperatura da coluna sobre a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre foi investigada após a otimização da composição da fase móvel na faixa compreendida entre 25 e 40°C. Para isso, a retenção dos analitos foi analisada através da construção do gráfico de van't Hoff, ilustrado na Figura 70.

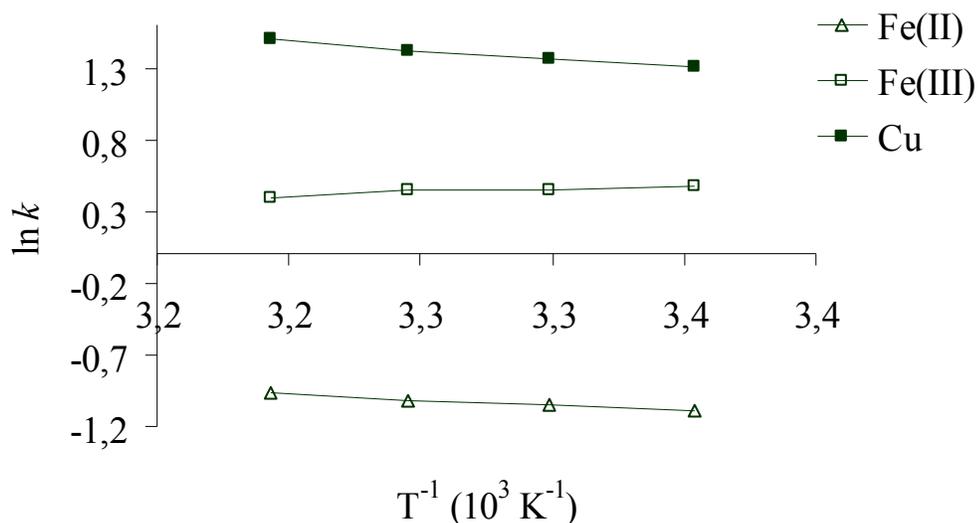


Figura 70. Gráfico de van't Hoff. Efeito da temperatura da coluna sobre a retenção de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹, HCl a 12 mmol L⁻¹ e MeOH a 50%, sob eluição isocrática a 0,8 mL min⁻¹. Volume de injeção de 100 µL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento.

Para os três íons avaliados na faixa de temperatura investigada, a regressão linear dos dados produziu as seguintes relações entre o $\ln k$ e a temperatura absoluta da coluna:

Ferro(II)

$$\ln k = -746,3T^{-1} + 1,4 \quad (10)$$

$$R^2 = 0,982$$

Ferro(III)

$$\ln k = 454,1T^{-1} - 1 \quad (11)$$

$$R^2 = 0,873$$

Cobre

$$\ln k = -1180T^{-1} + 5,3 \quad (12)$$

$$R^2 = 0,985$$

A variação de entalpia de transição do soluto entre as fases móvel e estacionária, $\Delta H_{m \rightarrow e}$, foi calculada com base no coeficiente angular da reta, b , de acordo com a Equação (9), descrita previamente no subcapítulo V.1.5.

Considerando $R = 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, as seguintes variações de entalpia foram calculadas:

Ferro(II)

$$\Delta H_{m \rightarrow e} = +6,2 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Ferro(III)

$$\Delta H_{m \rightarrow e} = -3,8 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Cobre

$$\Delta H_{m \rightarrow e} = +9,8 \text{ kJ mol}^{-1}$$

De forma análoga àquela já discutida para o sistema ADPC, o valor negativo obtido para o $\Delta H_{m \rightarrow e}$ do íon ferro(III) indica um mecanismo predominantemente regido pelo processo de troca iônica para a separação cromatográfica deste cátion, sendo um processo pouco mais exotérmico neste caso. Por outro lado, os valores positivos de $\Delta H_{m \rightarrow e}$ para os íons ferro(II) e cobre sugerem a predominância do mecanismo de separação governado por equilíbrios de complexação, sobretudo

para o cobre, cuja variação de entalpia demonstrou ser 1,6 vezes mais elevada que a do ferro(II) e praticamente o dobro em relação àquela obtida para o sistema ADPC.

Seguindo os mesmos critérios de avaliação empregados nas etapas anteriores de otimização, a eficiência da separação cromatográfica e a qualidade dos picos também foram analisadas. Os resultados obtidos são ilustrados nos gráficos das Figuras 71 e 72, que mostram como o número de pratos e o fator de assimetria, respectivamente, variam em função da temperatura da coluna.

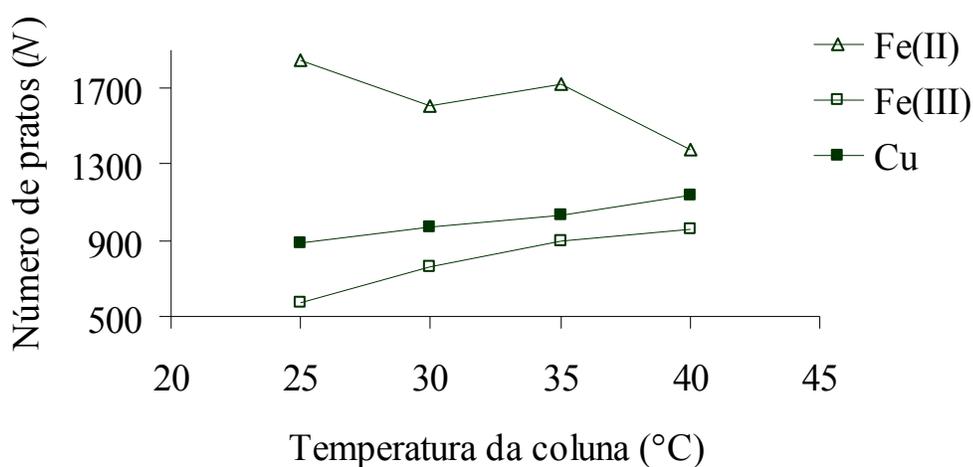


Figura 71. Efeito da temperatura da coluna sobre o número de pratos de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70.

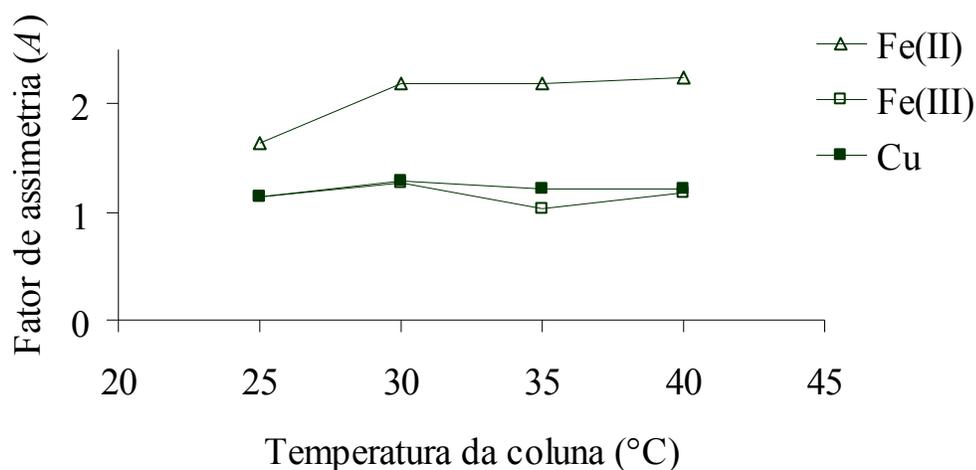


Figura 72. Efeito da temperatura da coluna sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70.

Uma proporcionalidade inversa pode ser observada para o número de pratos das duas espécies de ferro (Figura 71), indicando que a temperatura na qual uma apresenta a eficiência máxima a outra apresenta a eficiência mínima e vice-versa, sendo que o cobre acompanha o comportamento do ferro(III). Por outro lado, o perfil dos picos apresentou, em geral, os melhores valores para o fator de assimetria na temperatura de 25°C, de acordo com a Figura 72.

Portanto, com base nos parâmetros cromatográficos avaliados, visando maximizar novamente a eficiência da separação do ferro(III), a temperatura da coluna que apresentou o melhor desempenho neste sentido foi de 40°C. As Figuras 73 e 74 mostram os cromatogramas referentes aos dois extremos de temperatura avaliados, 25 e 40°C.

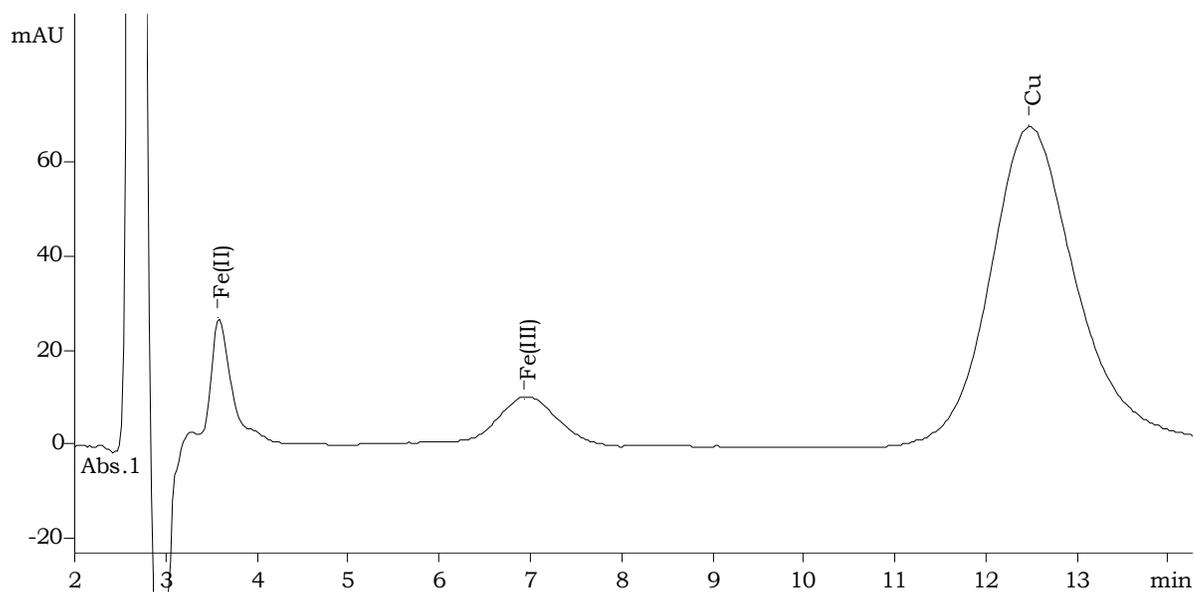


Figura 73. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. Temperatura da coluna mantida em 25°C.

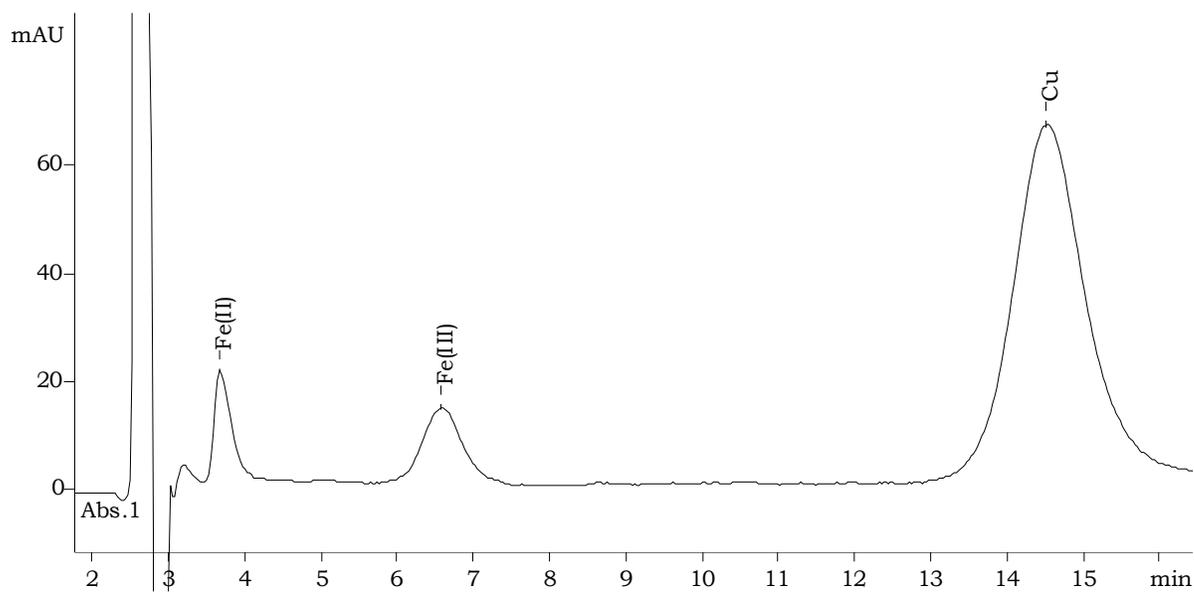


Figura 74. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 70. Temperatura da coluna mantida em 40°C.

VI.1.6 EFEITO DA VAZÃO DA FASE MÓVEL

Assim como para o sistema ADPC, a influência da vazão da fase móvel sobre a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre foi avaliada na faixa compreendida entre 0,5 e 1 mL min⁻¹. Para isso, a eficiência da separação dos analitos foi analisada através da construção da curva de van Deemter, ilustrada na Figura 75.

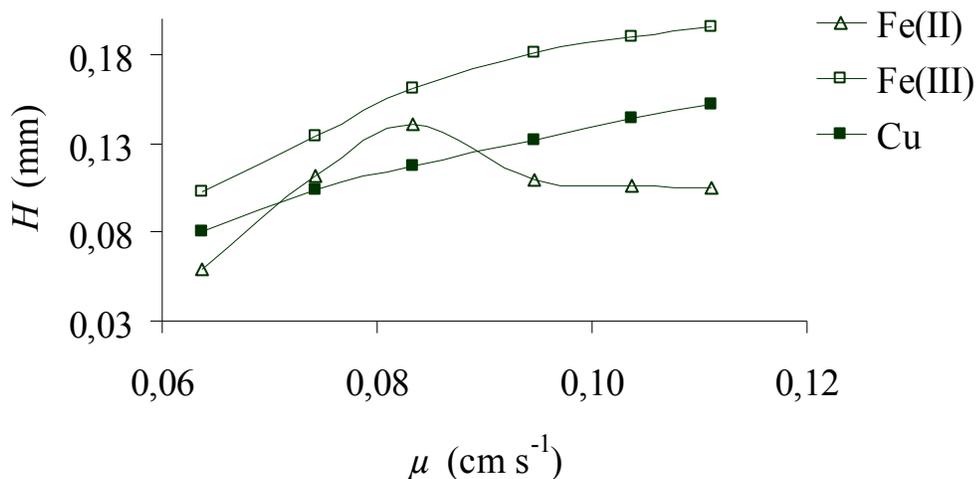


Figura 75. Curva de van Deemter. Efeito da vazão da fase móvel sobre a eficiência da separação cromatográfica de cada íon metálico. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.), mantida a 40°C. Eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L⁻¹, TEA a 3 mmol L⁻¹, HCl a 12 mmol L⁻¹ e MeOH a 50%. Volume de injeção de 100 μL. Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Soluções padrão multielementares preparadas em etanol puro contendo aproximadamente 1,3 mg L⁻¹ de cada elemento. H: altura de prato; μ : velocidade linear da fase móvel.

Da mesma forma observada para o sistema ADPC, a análise das curvas de van Deemter, esboçadas na Figura 75, indica que a separação do ferro(III) foi, numericamente, menos eficiente que a dos íons ferro(II) e cobre. Porém, neste caso, as reduções na eficiência com o aumento da vazão ocorreram de forma mais

constante, com uma média próxima de 47%. Entretanto, a curva obtida para o ferro(II) apresentou um aspecto anômalo. Isto pode ser explicado pelo perfil do pico desta espécie nos diversos experimentos, de acordo com os dados obtidos para o fator de assimetria, ilustrados no gráfico da Figura 76.

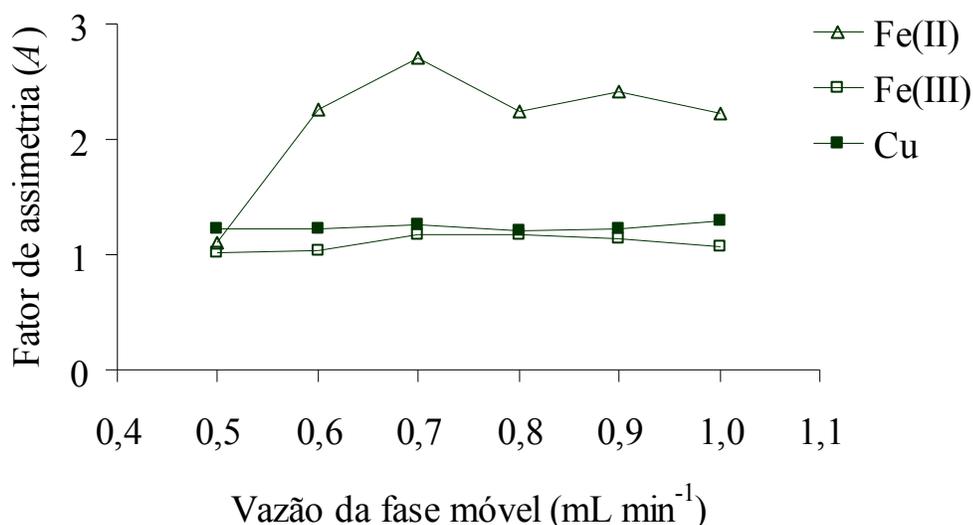


Figura 76. Efeito da vazão da fase móvel sobre o fator de assimetria de cada íon metálico. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 75.

De acordo com Snyder e Kirkland¹⁹⁰, o cálculo do número de pratos (N) e, conseqüentemente, da altura de prato (H), é somente confiável para picos com bandas simétricas. Neste sentido, quando o fator de assimetria (A) excede 1,6 para um determinado pico o valor de N pode ser superestimado. Assim sendo, no caso do ferro(II), a curva de van Deemter se mostrou inadequada, embora o emprego da menor vazão tenha produzido um resultado mais confiável para o seu valor de N , considerando que nesta condição o fator de assimetria se aproximou da unidade.

Portanto, levando em consideração as mesmas questões expostas na discussão do sistema anterior e o comportamento aqui observado, a vazão de 0,5 mL min⁻¹, correspondente à velocidade linear da fase móvel de 0,064 cm s⁻¹, foi aquela que se mostrou mais adequada para aplicações práticas. O cromatograma referente ao ensaio executado com essa vazão é mostrado na Figura 77.

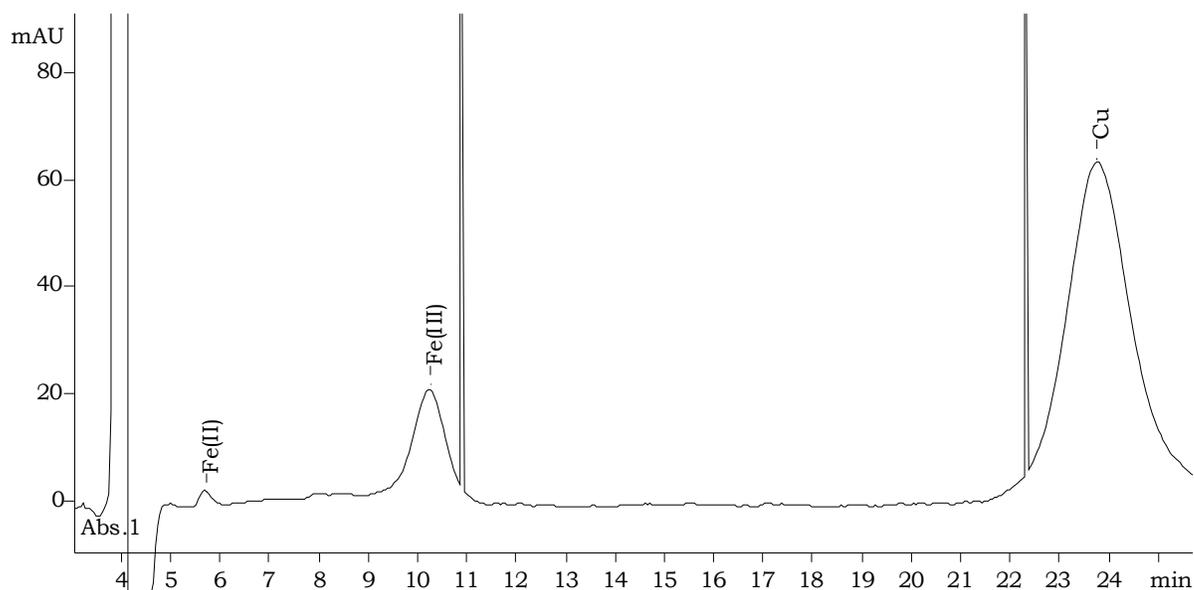


Figura 77. Cromatograma ilustrando a separação de ferro(II), ferro(III) e cobre. Mesmas condições experimentais descritas na Figura 75. Vazão da fase móvel de 0,5 mL min⁻¹. Os picos artefatos que aparecem no intervalo entre 22-23 minutos e em 11 minutos se referem à passagem de bolhas pelo detector.

Comparando o cromatograma apresentado na Figura 77 com aquele da Figura 41 para o sistema ADPC, ambos obtidos na mesma vazão da fase móvel e com a mesma concentração dos analitos, é possível verificar que no último exemplo o ferro(II) se mostrou mais estável em relação ao processo de oxidação.

Por outro lado, apesar do emprego da vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ter proporcionado os melhores e mais confiáveis resultados para a eficiência da separação dos três analitos, a sensibilidade analítica para o ferro(II) foi reduzida se compararmos o cromatograma anterior com aquele da Figura 74, que foi obtido com a vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

VI.1.7 INTERFERÊNCIA DE OUTROS METAIS

De forma similar aos procedimentos efetuados para o sistema ADPC, ao final do processo de otimização univariada dos diversos fatores envolvidos na separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre, a interferência de outros metais foi avaliada nas condições pré-estabelecidas.

O diagrama apresentado na Figura 78 ilustra a seletividade da separação cromatográfica obtida para os íons de interesse na presença dos seguintes elementos: Cd, Co, Mn, Pb e Zn. Nestas condições, nenhum sinal para o Ni foi observado, tendo sido injetado até uma concentração máxima de 7 mg L^{-1} .

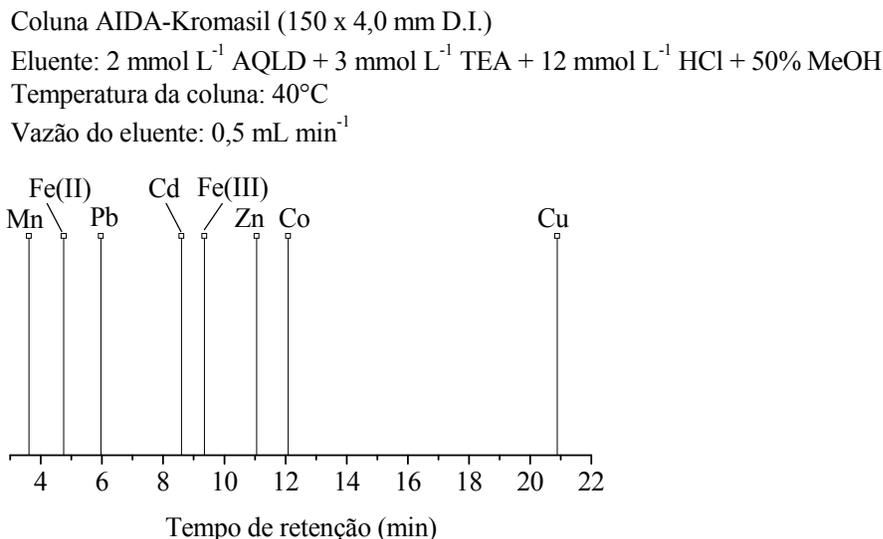


Figura 78. Diagrama de seletividade ilustrando a interferência de outros metais sobre a separação cromatográfica dos íons de interesse.

Embora o diagrama de seletividade apresentado na Figura 78 não demonstre claramente, foi observada a possível interferência do cádmio sobre a separação do ferro(III) devido ao perfil mais alargado do segundo pico, conforme ilustrado no cromatograma resultante do ensaio realizado com uma solução padrão multicomponente, mostrado a seguir na Figura 79.

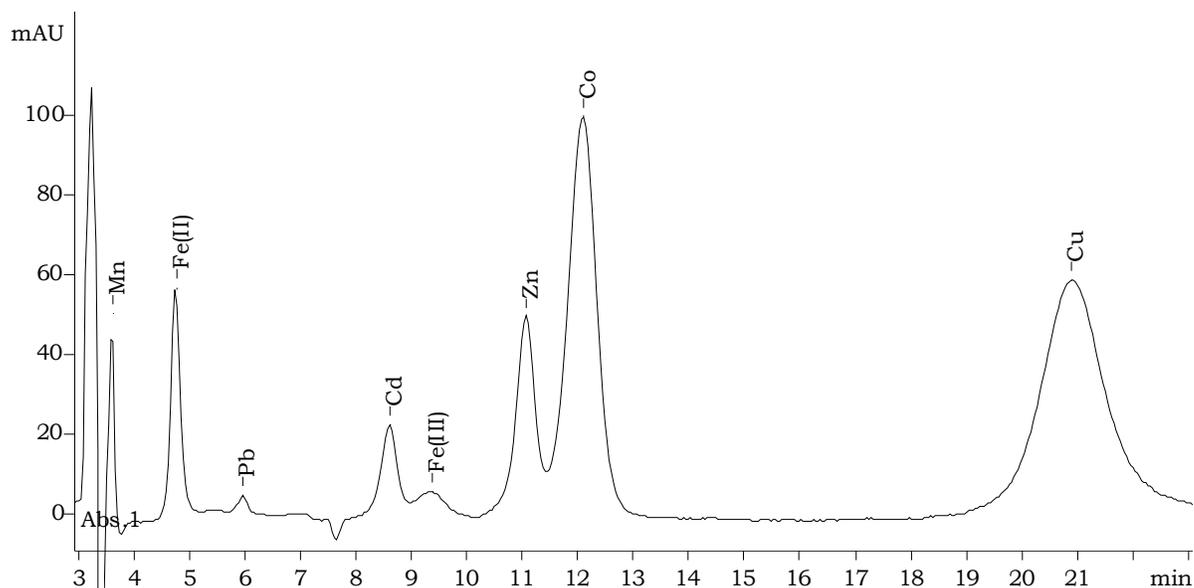


Figura 79. Cromatograma ilustrando a separação de oito constituintes metálicos nas condições experimentais previamente otimizadas, descritas no diagrama da Figura 78. Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 10 de Pb, 1 de Cd, 2 de Fe(III), 1 de Zn, 1 de Co e 2 de Cu. Resolução entre os picos de Fe(III) e Cd igual a 0,94.

Posteriormente, as colunas AIDA-Nucleosil foram testadas. Os resultados obtidos evidenciaram a coeluição do ferro(III) com o cádmio na coluna de 10 cm e, por isso, o cromatograma modelo apresentado na Figura 80 não contém este metal interferente. Por outro lado, a Figura 81 apresenta o cromatograma resultante da análise realizada com a coluna de 15 cm, onde é possível verificar uma menor resolução entre os picos de ferro(III) e cádmio em relação à coluna AIDA-Kromasil, reduzindo de 0,94 para 0,75.

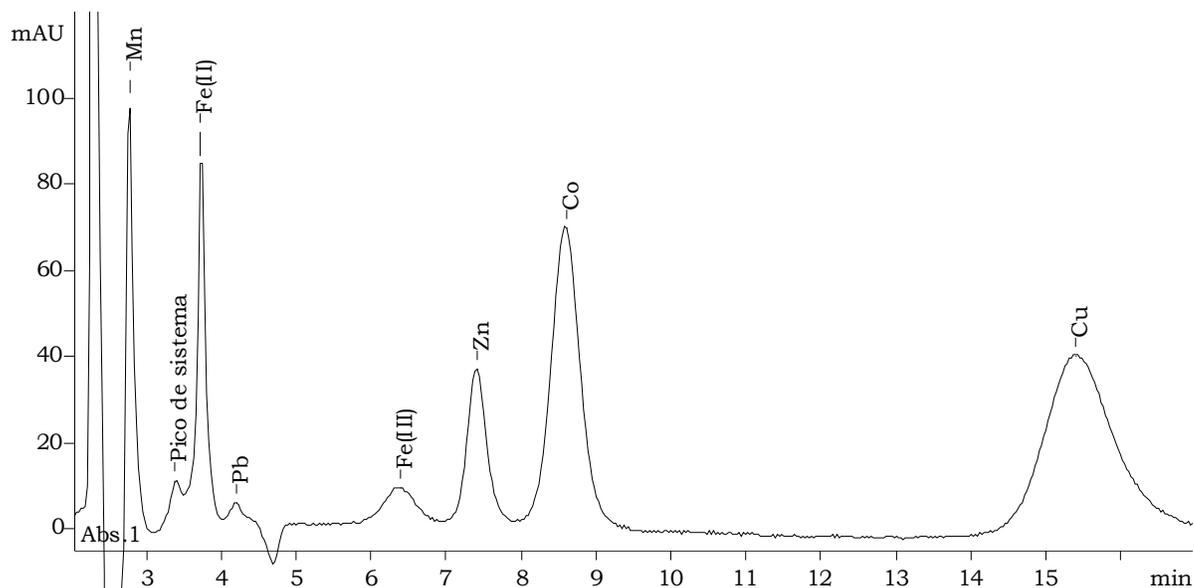


Figura 80. Cromatograma ilustrando a separação de sete constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L^{-1} : 0,25 de Mn, 3 de Fe(II), 10 de Pb, 2 de Fe(III), 0,5 de Zn, 0,5 de Co e 1 de Cu. Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 79. Nestas condições, o Cd pode coeluir com o Fe(III).

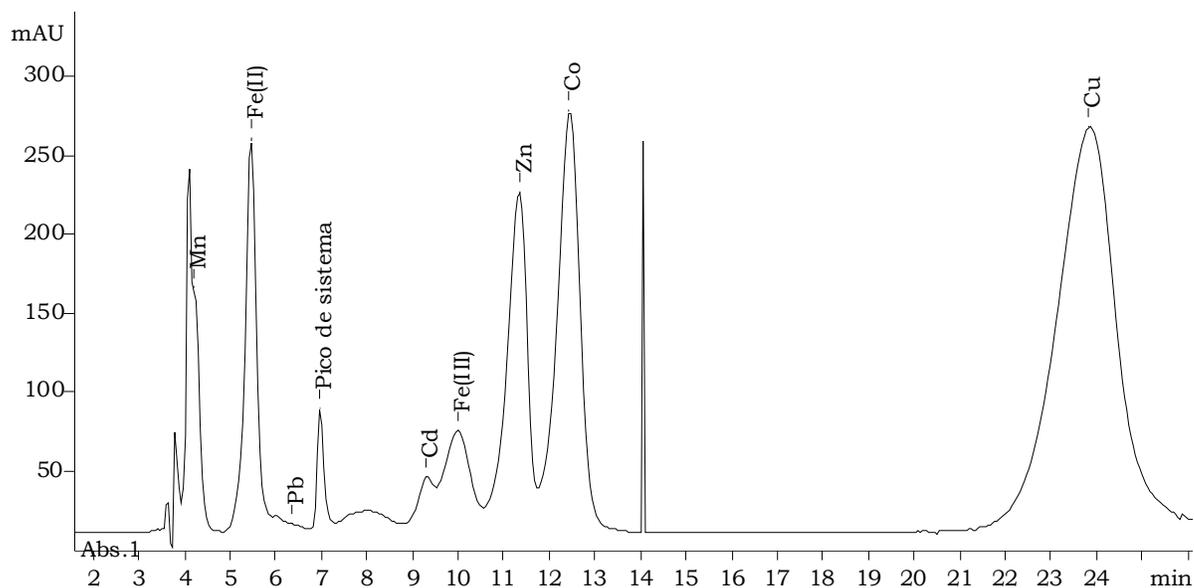


Figura 81. Cromatograma ilustrando a separação de oito constituintes metálicos. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Vazão do RPC de 0,36 mL min⁻¹. Solução padrão multielementar preparada em etanol puro contendo as seguintes concentrações de cada metal, em mg L⁻¹: 0,5 de Mn, 5 de Fe(II), 10 de Pb, 2 de Cd, 5 de Fe(III), 5 de Zn, 1 de Co e 5 de Cu. Demais condições experimentais semelhantes àquelas descritas na Figura 79. O pico artefato que aparece próximo de 14 minutos se refere à passagem de bolha pelo detector. Resolução entre os picos de Fe(III) e Cd igual a 0,75.

De acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras 79, 80 e 81, todas as colunas testadas apresentaram a mesma ordem de eluição. Contudo, a análise dos cromatogramas sugere que a coluna AIDA-Kromasil foi a que proporcionou a melhor seletividade da separação.

Ainda que tenha sido observada a possibilidade de interferência do cádmio sobre a separação do ferro(III), nenhum parâmetro otimizado foi alterado, considerando que alguns ajustes podem ser realizados a fim de contornar essa situação, por exemplo, o emprego simultâneo de outro comprimento de onda específico para as espécies de ferro, em torno de 715 nm, embora a sensibilidade seja reduzida, conforme pode ser observado no cromatograma da Figura 82, que

ilustra essa forma alternativa de identificar e quantificar as espécies de ferro na presença de possíveis interferentes, como o cádmio, neste caso.

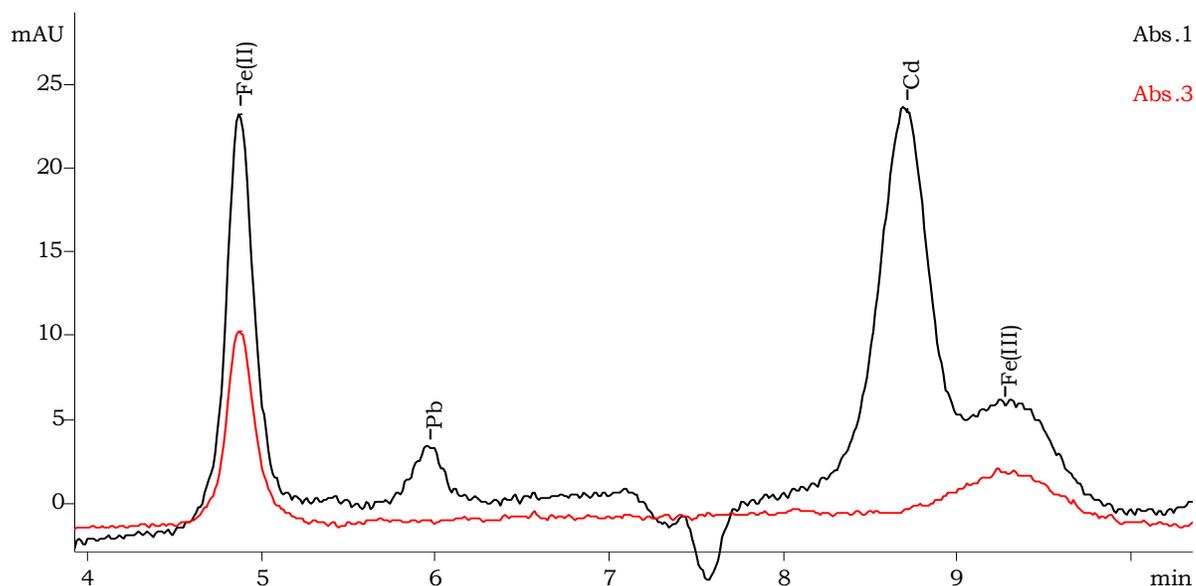


Figura 82. Cromatograma parcial ilustrando a separação de sete constituintes metálicos nas condições cromatográficas otimizadas. Coluna AIDA-Kromasil (150 x 4,0 mm D.I.). As linhas preta e vermelha representam os comprimentos de onda de detecção de 510 e 715 nm, respectivamente.

Além disso, de acordo com Gomes *et al.*¹⁹¹, o cádmio, em geral, não é encontrado em amostras de etanol combustível ou o seu conteúdo é cerca de 10 a 100 vezes menor que o de outros metais normalmente presentes, por exemplo, cobre, ferro, níquel e zinco.

Portanto, as condições finais otimizadas para a separação cromatográfica dos íons ferro(II), ferro(III) e cobre, livres da interferência dos diversos metais avaliados, são aquelas descritas no diagrama da Figura 78.

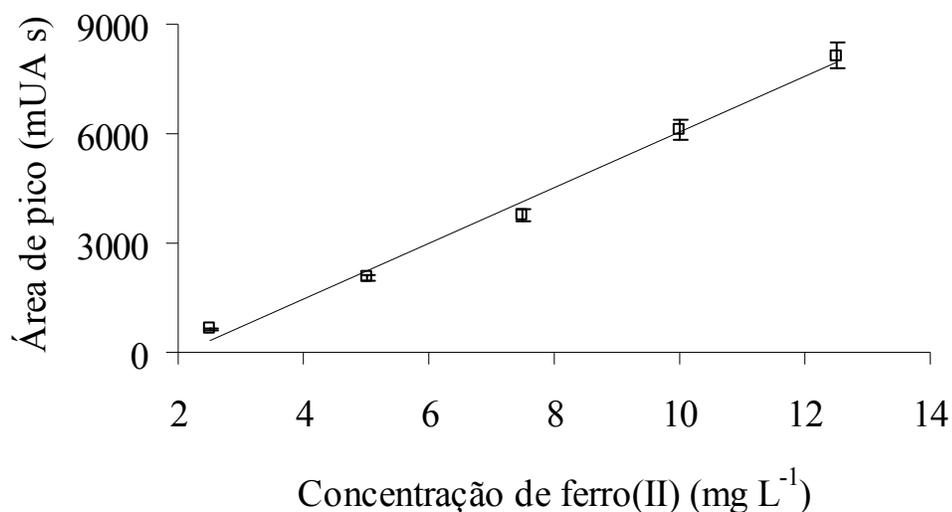
Diante do exposto, o sistema AQLD, desenvolvido para a separação cromatográfica de ferro e cobre em matriz etanólica, pode ser empregado satisfatoriamente para identificar e quantificar estes elementos, incluindo a especificação do primeiro.

VI.2 VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO MÉTODO

De forma semelhante àquela descrita anteriormente para o sistema ADPC, após a etapa de otimização univariada dos ensaios para a separação cromatográfica de ferro e cobre em etanol, diversos experimentos foram efetuados visando estabelecer os principais parâmetros analíticos para a validação da metodologia desenvolvida, sendo que, neste segundo sistema, além do zinco, o ferro(II) também foi incluído, considerando a sua estabilidade satisfatória para fins analíticos, conforme discutido previamente. Os resultados são apresentados na Tabela 15. As Figuras 83, 84, 85 e 86 ilustram as curvas analíticas obtidas para os íons ferro(II), ferro(III), zinco e cobre, respectivamente.

Tabela 15. Parâmetros analíticos obtidos para a separação e detecção dos íons metálicos em meio etanólico – Sistema AQLD.

Parâmetro	Analito			
	Ferro(II)	Ferro(III)	Zinco	Cobre
Sensibilidade (mUA s L μmol^{-1})	42,5	30,7	84,8	278,8
Faixa linear (mg L ⁻¹)	2,5-12,5	0,05-7,5	0,03-10	0,03-10
Coefficiente de determinação (R ²)	0,992	0,995	0,9982	0,9998
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,76	0,011	0,006	0,007
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	2,5	0,037	0,021	0,025
Precisão (%DPR)	4,4	3,9	0,4	3
Faixa de recuperação (%)	91-95	90-103	96-105	99-103

**Figura 83.** Curva analítica obtida para o ferro(II) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 2,5-12,5 mg L⁻¹ (n = 5) – Sistema AQLD.

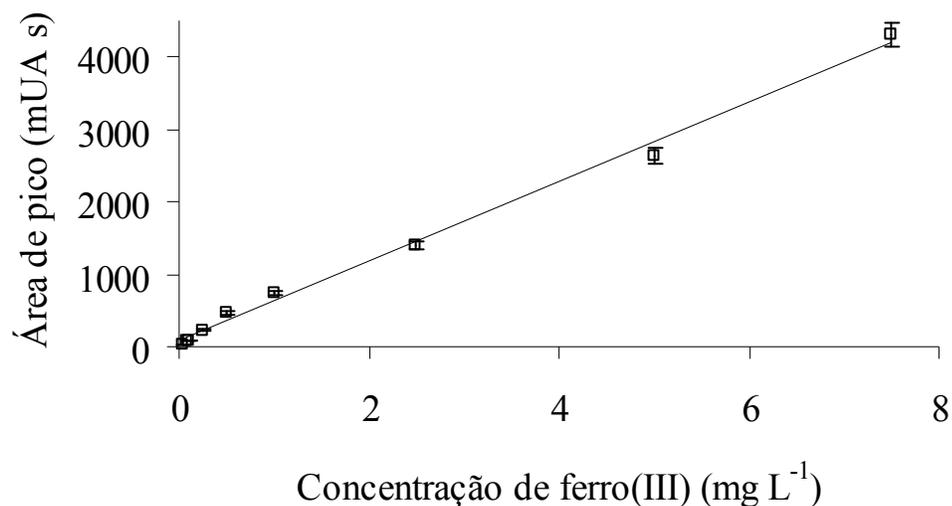


Figura 84. Curva analítica obtida para o ferro(III) nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,05-7,5 mg L⁻¹ (n = 9) – Sistema AQLD.

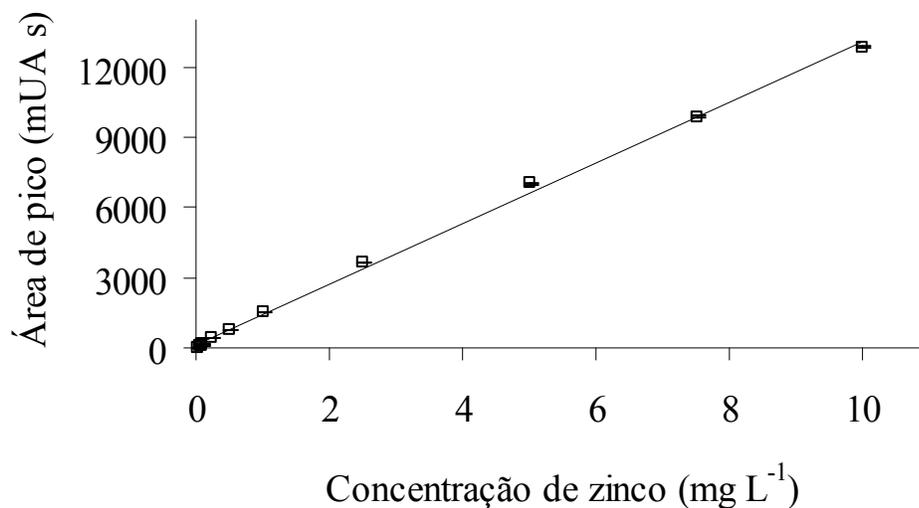


Figura 85. Curva analítica obtida para o zinco nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 11) – Sistema AQLD.

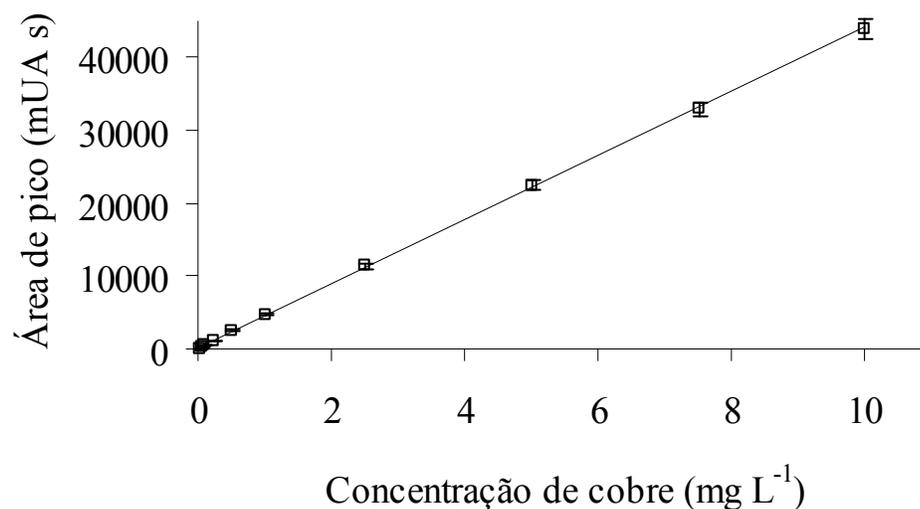


Figura 86. Curva analítica obtida para o cobre nas condições cromatográficas previamente otimizadas. Faixa de concentração: 0,03-10 mg L⁻¹ (n = 10) – Sistema AQLD.

Certamente, o ferro(II) já apresentava um certo grau de oxidação nas soluções padrão antes da injeção no cromatógrafo, em ambos os sistemas (ADPC e AQLD), o que justifica os valores de recuperação abaixo de 100% para este íon (sistema AQLD). Porém, no processo cromatográfico o ferro(II) é claramente mais estável com o AQLD, pois a elevação da linha de base entre as espécies de ferro, a qual representa a continuação do processo de oxidação ao longo da separação, é bem menos pronunciada em relação ao sistema ADPC, conforme pode ser observado pela análise comparativa dos cromatogramas da Figura 87, ambos obtidos para soluções padrão contendo 5 mg L⁻¹ de ferro(II) em etanol, analisadas pelos diferentes métodos desenvolvidos.

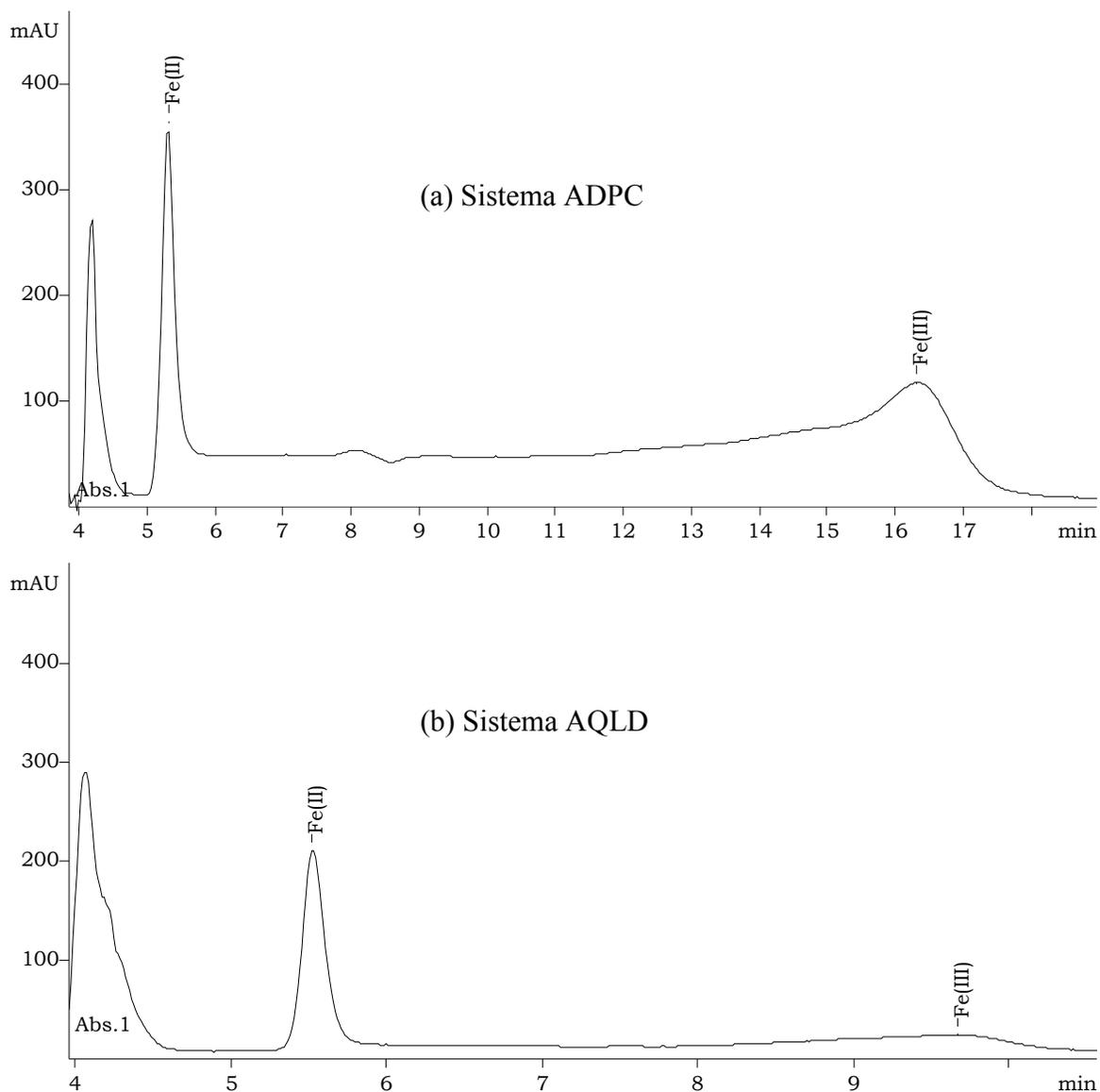


Figura 87. Cromatogramas obtidos para soluções padrão contendo 5 mg L^{-1} de ferro(II) em etanol, analisadas pelos diferentes métodos desenvolvidos. Vazão da fase móvel de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Volume de injeção de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Vazão do RPC de $0,36 \text{ mL min}^{-1}$. (a) Sistema ADPC: Coluna AIDA-Nucleosil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$), mantida a 45°C , eluente composto por uma solução mista de ADPC a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, HCl a 10 mmol L^{-1} e MeOH a 60%. (b) Sistema AQLD: Coluna AIDA-Nucleosil ($150 \times 4,0 \text{ mm D.I.}$), mantida a 40°C , eluente composto por uma solução mista de AQLD a 2 mmol L^{-1} , TEA a 3 mmol L^{-1} , HCl a 12 mmol L^{-1} e MeOH a 50%.

Comparando os cromatogramas apresentados na Figura 87 é possível observar nitidamente a diferença em relação à intensidade da elevação da linha de base entre as espécies de ferro, sugerindo que, ao longo da eluição, o AQLD estabiliza o ferro(II) mais que o ADPC. Entretanto, por alguma razão a detectabilidade do método para o ferro(II) foi relativamente alta (sistema AQLD), embora a intensidade do pico obtido para a solução contendo 5 mg L^{-1} desta espécie sugira o contrário. Porém, isto não afeta a sua aplicabilidade para a finalidade proposta, tendo em vista que o limite máximo permitido para o conteúdo total de ferro em etanol combustível é cerca de 6,6 vezes maior que o limite de detecção obtido neste trabalho.

Comparando os parâmetros analíticos obtidos para o sistema AQLD com aqueles obtidos para o sistema ADPC, é possível verificar que a sensibilidade analítica obtida para o zinco foi cerca de 4 vezes maior para o primeiro método e a sua detectabilidade 3 vezes menor, porém, ambos os métodos apresentaram níveis detectáveis na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que, no segundo sistema os resultados foram muito mais precisos.

Por outro lado, é interessante notar que, embora a detectabilidade do segundo método para a determinação de ferro(III) seja somente 1,2 vezes maior em relação ao primeiro, a sensibilidade analítica para esta espécie é cerca de 14 vezes maior no primeiro sistema. Entretanto, ambos os métodos foram considerados adequados para aplicações práticas, tendo em vista os baixos níveis de detecção obtidos com precisão e exatidão satisfatórias.

No caso do cobre, os resultados indicaram que os dois sistemas desenvolvidos apresentaram desempenhos muito parecidos para este metal. Através da comparação dos dados das Tabelas 14 e 15, é possível verificar que praticamente todos os parâmetros analíticos obtidos foram semelhantes dentro da

mesma faixa linear, exceto a faixa de recuperação, que se mostrou mais exata para o sistema AQLD.

Finalmente, as mesmas amostras de AEHC analisadas pelo método ADPC foram utilizadas para demonstrar a aplicabilidade do método AQLD e confirmar o desempenho dos dois sistemas. Os cromatogramas referentes aos ensaios executados são apresentados a seguir nas Figuras 88 e 89 para as amostras A e B, respectivamente. Os resultados obtidos confirmaram a presença de cobre na amostra A e, embora o zinco também estivesse presente, já era esperado que o mesmo não fosse identificado, considerando que nesse segundo sistema este metal apresentou um LD 3 vezes maior que aquele do primeiro.

Da mesma forma procedida para o primeiro método, a concentração indicada na legenda da Figura 88 é uma estimativa, tendo sido calculada com base no ensaio efetuado posteriormente com a amostra B (isenta de metais), por adição de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada íon, usando a coluna AIDA-Nucleosil de 15 cm, cujo cromatograma resultante para o sistema AQLD é mostrado na Figura 89.

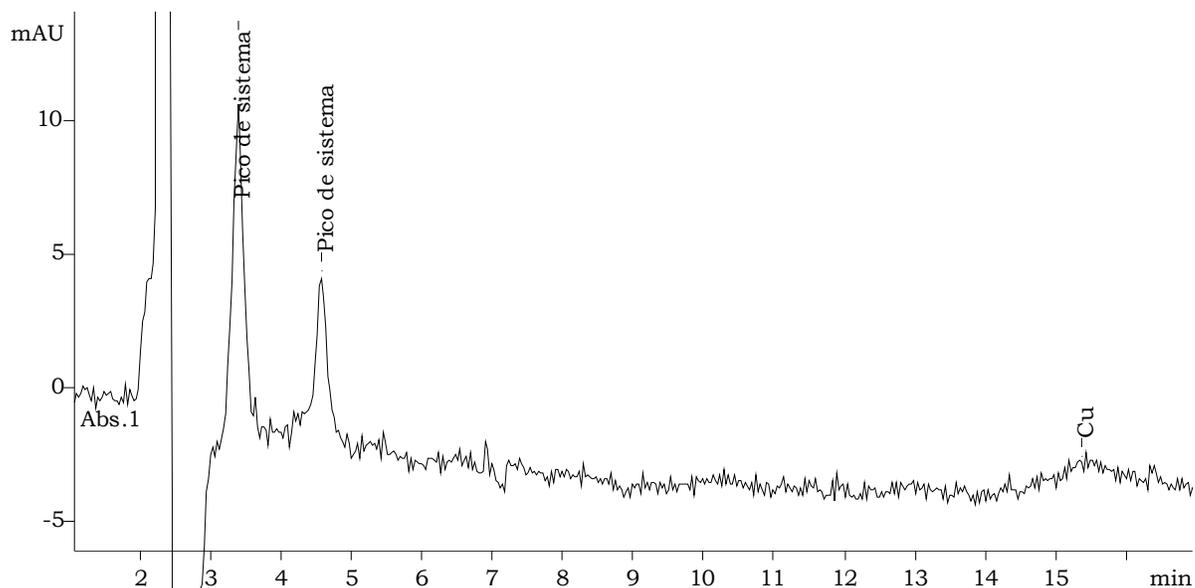


Figura 88. Cromatograma ilustrando a separação de cobre presente em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra A – nas condições previamente otimizadas. Coluna AIDA-Nucleosil (100 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,82 mL min^{-1} . Concentração estimada para o cobre: 11 $\mu\text{g L}^{-1}$.

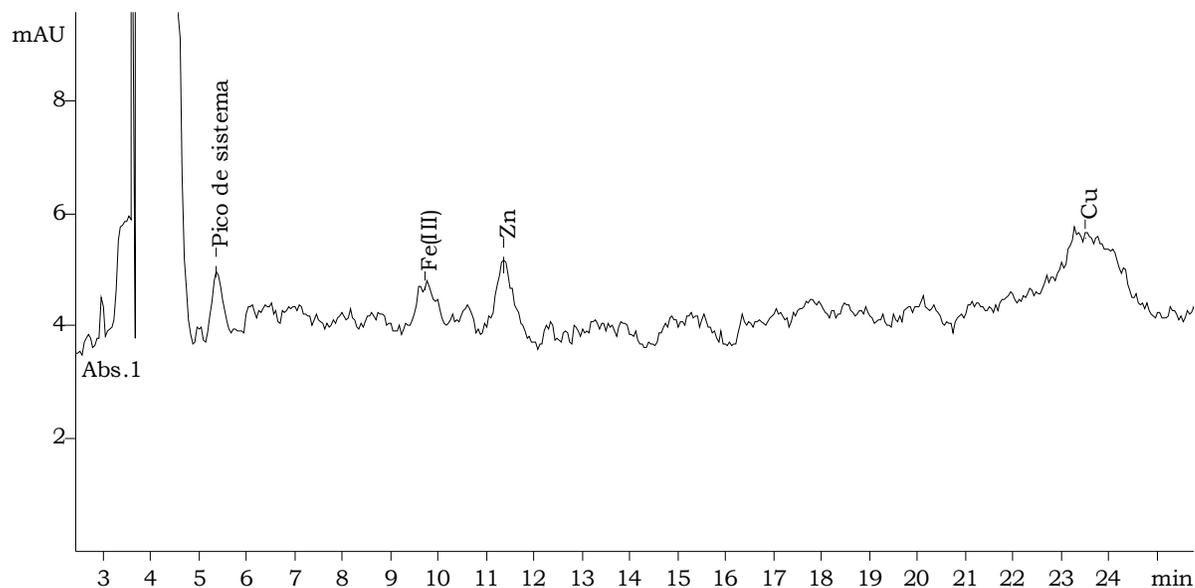


Figura 89. Cromatograma ilustrando a separação dos constituintes metálicos adicionados (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada) em uma amostra selecionada de etanol combustível (AEHC) – Amostra B – nas condições previamente otimizadas – Sistema AQLD. Coluna AIDA-Nucleosil (150 x 4,0 mm D.I.). Volume de injeção de 100 μL . Vazão do RPC de 0,36 mL min^{-1} .

Em função do tempo disponível, não foi possível investigar precisamente os efeitos das diversas variáveis envolvidas no processo de detecção fotométrica dos íons metálicos para os dois sistemas desenvolvidos (ADPC e AQLD), entre elas, o tipo e a concentração do reagente cromóforo usado no reator pós-coluna, o comprimento de onda de detecção, o volume da bobina (*coil*) de reação, a vazão do RPC, o volume de injeção, etc. Neste caso, o parâmetro cromatográfico avaliado em função dos efeitos dessas variáveis é, geralmente, a área de pico.

Diante do exposto, considerando que o processo de derivatização pós-coluna envolve equilíbrios de complexação entre o quelato do eluente e o quelato do reagente cromóforo, tais fatores ainda podem ser investigados no sentido de avaliar a cinética das reações de equilíbrio, que é dependente, sobretudo, da velocidade total de eluição da mistura reacional e do volume da bobina (*coil*), onde ocorrem as reações. Em geral, um acréscimo dessas variáveis, bem como do volume de injeção, proporciona um aumento na sensibilidade analítica do método.

Por outro lado, os sistemas cromatográficos desenvolvidos também podem ser usados com outras técnicas de detecção, por exemplo, DAP. Neste caso, somente a sensibilidade e, conseqüentemente, a detectabilidade serão afetadas.

Portanto, diante das considerações feitas, é possível afirmar que o método desenvolvido para o sistema AQLD também se mostrou adequado para a separação e quantificação de ferro e cobre em bioetanol de acordo com as normas vigentes, sendo que este apresentou a vantagem de quantificar satisfatoriamente as duas espécies de ferro, embora aqui tenha sido observada a possibilidade de interferência do cádmio sobre o ferro(III) em função do comprimento da coluna utilizada. Porém, isso pode ser facilmente resolvido pelo emprego simultâneo de outro comprimento de onda específico para as espécies de ferro, conforme explicado e

ilustrado anteriormente. Além disso, outros metais também podem ser identificados e quantificados nas mesmas condições experimentais.

CAPÍTULO VII

Conclusões Gerais

Os diversos procedimentos de otimização (uni e multivariada) permitiram estabelecer as melhores condições para a separação eficiente e seletiva dos diferentes analitos em solução etanólica.

Neste sentido, os dados obtidos da otimização multivariada dos experimentos para a separação e detecção dos ânions usando a técnica de CLTI-DC indicaram nitidamente vários efeitos significativos no nível de 95% de confiança. Os resultados gerados sugerem que um incremento na concentração de acetonitrila na fase móvel, na temperatura da coluna e no volume de injeção, proporciona, em geral, um aumento na eficiência da separação cromatográfica das espécies aniônicas de interesse. Diante disso, as condições finais otimizadas foram estabelecidas e validadas, sendo incluídos os íons cloreto e sulfato.

Os dados dos ensaios de otimização univariada para a separação e detecção dos íons metálicos usando a técnica de CLQI-DF demonstraram os vários efeitos das diversas variáveis investigadas sobre o processo cromatográfico.

Dois novos sistemas cromatográficos foram estabelecidos para a separação e detecção de íons metálicos em etanol combustível com injeção direta de amostra, estando entre os melhores já desenvolvidos até o presente por CLQI. O primeiro é à base do ADPC, sendo possível separar, no mínimo, nove íons metálicos em menos de 20 minutos, incluindo a especiação de ferro, embora a espécie de menor valência possa ser somente identificada. No segundo sistema, o AQLD foi empregado pela primeira vez em cromatografia, permitindo a separação de até oito íons metálicos em menos de 23 minutos, com a vantagem de possibilitar a quantificação confiável do ferro(II), considerando a aparente melhora na estabilização desta espécie no sistema cromatográfico. Além disso, ambos os sistemas estabelecidos possuem uma baixa concentração de agente quelante, entre 2 e 2,5 mmol L⁻¹, reduzindo o custo das análises e a competição com o PAR na etapa de reação pós-coluna.

Portanto, os dois métodos cromatográficos desenvolvidos para a determinação de ferro e cobre em etanol combustível, ambos alternativos aos métodos espectroscópicos definidos nas especificações em vigor, podem ser empregados satisfatoriamente para identificar e quantificar seletivamente estes elementos, de acordo com as normas vigentes, além de possibilitar a determinação conjunta destes com outros metais e a especiação do ferro, que foi relatada pela primeira vez por este estudo para aplicação em amostras de bioetanol.

De maneira geral, o conjunto dos resultados almejados e alcançados evidenciou o desempenho aceitável e a aplicabilidade dos três métodos desenvolvidos, todos sem a necessidade de pré-tratamento de amostra. Determinações sequenciais relativamente rápidas, precisas e confiáveis foram demonstradas e, com exceção do ferro(II), todos os analitos apresentaram baixos níveis de detectabilidade, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, as condições estabelecidas podem ser aplicadas em análises de outros tipos de amostras com teor alcoólico elevado, por exemplo, bebidas destiladas.

CAPÍTULO VIII

Referências Bibliográficas

1. Pohl, C. Recent developments in ion-exchange columns for inorganic ions and low molecular weight molecules. *LC-GC Europe* **2003**, *16* (6A), 51-54.
2. Sarzanini, C. Recent developments in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, *956* (1-2), 3-13.
3. Xu, Q.; Zhang, W.; Xu, C.; Jin, L. T. Continuous and simultaneous determination of anions and cations in rainwater by ion chromatography. *Analyst* **2000**, *125* (6), 1065-1069.
4. Nesterenko, P. N.; Tarasenko, D. A.; Shpigun, O. A. Simultaneous determination of anions and cations by ion chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* **1994**, *49* (3), 222-233.
5. Nesterenko, P. N. Simultaneous separation and detection of anions and cations in ion chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20* (6-7), 311-319.
6. Nesterenko, E. P.; Nesterenko, P. N.; Paull, B. Zwitterionic ion-exchangers in ion chromatography: A review of recent developments. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *652* (1-2), 3-21.
7. Nesterenko, E. P.; Nesterenko, P. N.; Paull, B. Simultaneous separation of inorganic anions and metal-citrate complexes on a zwitterionic stationary phase with on-column complexation. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1213* (1), 62-69.
8. Kiseleva, M. G.; Kebets, P. A.; Nesterenko, P. N. Simultaneous ion chromatographic separation of anions and cations on poly(aspartic acid) functionalized silica. *Analyst* **2001**, *126* (12), 2119-2123.
9. Jones, V. K.; Frost, S. A.; Tarter, J. G. Simultaneous ion chromatographic analysis of anions and mono-valent or divalent-cations. *Journal of Chromatographic Science* **1985**, *23* (10), 442-445.
10. Jiang, W.; Irgum, K. Covalently bonded polymeric zwitterionic stationary phase for simultaneous separation of inorganic cations and anions. *Analytical Chemistry* **1999**, *71* (2), 333-344.
11. Hu, W. Z.; Tao, H.; Tominaga, M.; Miyazaki, A.; Haraguchi, H. A new approach for the simultaneous determination of inorganic cations and anions using ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1994**, *299* (2), 249-256.
12. Deguchi, K.; Kohda, K.; Ito, M. Simultaneous separation of anions and cations by flow-gradient ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, *845* (1-2), 165-170.

13. Bruzzoniti, M. C.; Mentasti, E.; Sarzanini, C. Simultaneous determination of inorganic anions and metal ions by suppressed ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 382 (3), 291-299.
14. Abd Karim, K. J. B.; Jin, J. Y.; Takeuchi, T. Simultaneous separation of inorganic anions and cations by using anion-exchange and cation-exchange columns connected in tandem in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 995 (1-2), 153-160.
15. Haddad, P. R.; Nesterenko, P. N.; Buchberger, W. Recent developments and emerging directions in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1184 (1-2), 456-473.
16. Haddad, P. R.; Jackson, P. T. *Ion Chromatography: Principles and Applications*; Elsevier Science: Amsterdam, 1990.
17. Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*; Third ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004; Vol. 1.
18. Fritz, J. S.; Gjerde, D. T. *Ion Chromatography*; Fourth ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
19. Jones, P.; Nesterenko, P. N. High-performance chelation ion chromatography - A new dimension in the separation and determination of trace metals. *Journal of Chromatography A* **1997**, 789 (1-2), 413-435.
20. Nesterenko, P. N.; Jones, P. Recent developments in the high-performance chelation ion chromatography of trace metals. *Journal of Separation Science* **2007**, 30 (11), 1773-1793.
21. Jones, P.; Nesterenko, P. N. Chelation ion chromatography. In *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed.; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Eds.; Elsevier Academic: Oxford, 2005; pp 467-481.
22. Michalski, R. Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2006**, 36 (2), 107-127.
23. Small, H. Ion chromatography: An account of its conception and early development. *Journal of Chemical Education* **2004**, 81 (9), 1277-1284.
24. Small, H. 20 years of ion chromatography. *Journal of Chromatography* **1991**, 546 (1-2), 3-15.
25. Small, H.; Stevens, T. S.; Bauman, W. C. Novel ion-exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry* **1975**, 47 (11), 1801-1809.

26. Gjerde, D. T.; Schmuckler, G.; Fritz, J. S. Anion chromatography with low-conductivity eluents .2. *Journal of Chromatography* **1980**, *187* (1), 35-45.
27. Gjerde, D. T.; Fritz, J. S. Chromatographic separation of metal ions on macroreticular anion-exchange resins of a low capacity. *Journal of Chromatography* **1980**, *188* (2), 391-399.
28. Gjerde, D. T.; Fritz, J. S.; Schmuckler, G. Anion chromatography with low-conductivity eluents. *Journal of Chromatography* **1979**, *186* (DEC), 509-519.
29. Gjerde, D. T.; Fritz, J. S. Effect of capacity on the behavior of anion-exchange resins. *Journal of Chromatography* **1979**, *176* (2), 199-206.
30. Werner, A. Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen. *Zeitschrift für anorganische Chemie* **1893**, *3* (1), 267-330.
31. Morgan, G. T.; Drew, H. D. K. Researches on residual affinity and co-ordination. Part II. Acetylacetones of selenium and tellurium. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1920**, *117*, 1456-1465.
32. Yu, L. W.; Floyd, T. R.; Hartwick, R. A. The synthesis and characterization of chemically bonded silica-based zwitterion-exchangers for HPLC. *Journal of Chromatographic Science* **1986**, *24* (5), 177-182.
33. Weiss, J.; Jensen, D. Modern stationary phases for ion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *375* (1), 81-98.
34. Paull, B.; Nesterenko, P. N. Novel ion chromatographic stationary phases for the analysis of complex matrices. *Analyst* **2005**, *130* (2), 134-146.
35. Auler, L. M. L. A.; Silva, C. R.; Collins, K. E.; Collins, C. H. New stationary phase for anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1073* (1-2), 147-153.
36. Buchberger, W. W. Detection techniques in ion chromatography of inorganic ions. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20* (6-7), 296-303.
37. Buchberger, W. W.; Haddad, P. R. Advances in detection techniques for ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, *789* (1-2), 67-83.
38. Buchberger, W. W. Detection techniques in ion analysis: what are our choices? *Journal of Chromatography A* **2000**, *884* (1-2), 3-22.
39. Yashin, Y. I.; Yashin, A. Y.; Walton, H. F. Ion chromatography instrumentation. In *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed.; Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Eds.; Elsevier Academic: Oxford, 2005; pp 453-460.

40. Yashin, Y. I.; Yashin, A. Y. Analytical chromatography. Methods, instrumentation and applications. *Russian Chemical Reviews* **2006**, *75* (4), 329-340.
41. Sander, L. C.; Wise, S. A. The influence of column temperature on selectivity in reversed-phase liquid chromatography for shape-constrained solutes. *Journal of Separation Science* **2001**, *24* (12), 910-920.
42. Pohl, C. A.; Stillian, J. R.; Jackson, P. E. Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, *789* (1-2), 29-41.
43. Lippa, K. A.; Rimmer, C. A.; Sander, L. C. *Shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography*; CRC Press - Taylor & Francis: Boca Raton, 2008; Vol. 46.
44. Hao, Z. G.; Xiao, B. M.; Weng, N. D. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science* **2008**, *31* (9), 1449-1464.
45. Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. Optimization of selectivity in liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **1983**, *55* (2), A319-&.
46. Billiet, H. A. H.; Rippel, G. *Method development and selectivity optimization in high-performance liquid chromatography*; Marcel Dekker: New York, 1998; Vol. 39.
47. Bruce, J. Analysis of anions in beer using ion chromatography. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry* **2002**, *24* (4), 127-130.
48. Chen, Z. F.; Darvell, B. W.; Leung, V. W. H. Validation of ion chromatography for human salivary anionic analysis. *Archives of Oral Biology* **2004**, *49* (11), 855-862.
49. Dias, J. C.; Suzuki, E.; de Albuquerque, C. L.; Ferreira, A. L.; Brito, A. R. M. S.; Kubota, L. T. Determination of short-chain fatty acids in dietary fiber extracts using ion-exclusion chromatography with suppressed conductivity detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, *49* (4), 1128-1132.
50. Ding, M. Y.; Suzuki, Y.; Koizumi, H. Simultaneous determination of organic-acids, inorganic anions and cations in beverages by ion chromatography with a mixed-bed stationary-phase of anion and cation-exchangers. *Analyst* **1995**, *120* (6), 1773-1777.
51. El Aribi, H.; Le Blanc, Y. J. C.; Antonsen, S.; Sakuma, T. Analysis of perchlorate in foods and beverages by ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry (IC-ESI-MS/MS). *Analytica Chimica Acta* **2006**, *567* (1), 39-47.
52. Lu, H. T.; Mou, S. F.; Riviello, J. M. Use of ion chromatography for the determination of heavy and transition metals in biochemical samples. *Journal of Chromatography A* **1999**, *857* (1-2), 343-349.

53. Michalski, R.; Kurzyca, I. Determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies* **2006**, *15* (1), 5-18.
54. Milstein, L. S.; Essader, A.; Pellizzari, E. D.; Fernando, R. A.; Raymer, J. H.; Levine, K. E.; Akinbo, O. Development and application of a robust speciation method for determination of six arsenic compounds present in human urine. *Environmental Health Perspectives* **2003**, *111* (3), 293-296.
55. Obrezkov, O. N.; Tolkacheva, V. A.; Zaikanova, G. I.; Yamnikov, V. A.; Krokhin, O. V.; Zhukov, S. P.; Shpigun, O. A. The use of ion chromatography in vodka and liqueur production. Determination of transition metals. *Industrial Laboratory* **2000**, *66* (1), 18-21.
56. Ohta, K.; Tanaka, K.; Fritz, J. S. Non-suppressed ion chromatography of inorganic anions, magnesium and calcium ions using a pyromellitate eluent and its application in evaluating environmental water quality. *Journal of Chromatography A* **1996**, *731* (1-2), 179-186.
57. Rahmalan, A.; Abdullah, M. Z.; Sanagi, M. M.; Rashid, M. Determination of heavy metals in air particulate matter by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1996**, *739* (1-2), 233-239.
58. Sarzanini, C.; Bruzzoniti, M. C. New materials: analytical and environmental applications in ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *540* (1), 45-53.
59. Shaw, M. J.; Hill, S. J.; Jones, P.; Nesterenko, P. N. Determination of beryllium in a stream sediment by high-performance chelation ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *876* (1-2), 127-133.
60. Shaw, M. J.; Haddad, P. R. The determination of trace metal pollutants in environmental matrices using ion chromatography. *Environment International* **2004**, *30* (3), 403-431.
61. Zhang, Z. H.; Ding, H. C.; Fang, Y. J.; Xian, Y. Z.; Jin, L. T. Study on determination of chemical oxygen demand in water with ion chromatography. *Chinese Journal of Chemistry* **2007**, *25* (2), 228-232.
62. Buchberger, W.; Winsauer, K. Alumina as stationary phase for ion chromatography and column-coupling techniques. *Journal of Chromatography* **1989**, *482* (2), 401-406.
63. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*; Editora da Unicamp: Campinas, 2006.
64. Yamamoto, M.; Yamamoto, H.; Yamamoto, Y.; Matsushita, S.; Baba, N.; Ikushige, T. Simultaneous determination of inorganic anions and cations by ion

- chromatography with ethylenediaminetetraacetic acid as eluent. *Analytical Chemistry* **1984**, 56 (4), 832-834.
65. Ohta, K.; Tanaka, K. Suppressed ion chromatography of inorganic anions and divalent metal cations with pyromellitic acid as eluent. *Journal of Chromatography A* **1998**, 804 (1-2), 87-93.
66. Nesterenko, P. N.; Elefterov, A. I.; Tarasenko, D. A.; Shpigun, O. A. Selectivity of chemically bonded zwitterion-exchange stationary phases in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, 706 (1-2), 59-68.
67. Qiu, H. D.; Jiang, Q.; Wei, Z.; Wang, X. S.; Liu, X.; Jiang, S. X. Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1163 (1-2), 63-69.
68. Nesterenko, P. N.; Haddad, P. R. Diamond-related materials as potential new media in separation science. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 396 (1), 205-211.
69. Nesterenko, P. N.; Fedyanina, O. N.; Volgin, Y. V.; Jones, P. Ion chromatographic investigation of the ion-exchange properties of microdisperse sintered nanodiamonds. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1155 (1), 2-7.
70. Connolly, D.; Victory, D.; Paull, B. Rapid, low pressure, and simultaneous ion chromatography of common inorganic anions and cations on short permanently coated monolithic columns. *Journal of Separation Science* **2004**, 27 (10-11), 912-920.
71. Faria, A. M.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Química Nova* **2006**, 29 (2), 300-309.
72. Hatsis, P.; Lucy, C. A. Ultra-fast HPLC separation of common anions using a monolithic stationary phase. *Analyst* **2002**, 127 (4), 451-454.
73. Schaller, D.; Hilder, E. F.; Haddad, P. R. Monolithic stationary phases for fast ion chromatography and capillary electrochromatography of inorganic ions. *Journal of Separation Science* **2006**, 29 (12), 1705-1719.
74. Watanabe, Y.; Ikegami, T.; Horie, K.; Hara, T.; Jaafar, J.; Tanaka, N. Improvement of separation efficiencies of anion-exchange chromatography using monolithic silica capillary columns modified with polyacrylates and polymethacrylates containing tertiary amino or quaternary ammonium groups. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216 (44), 7394-7401.

75. Xu, Q.; Mori, M.; Tanaka, K.; Ikedo, M.; Hu, W. Z. Dodecylsulfate-coated monolithic octadecyl-bonded silica stationary phase for high-speed separation of hydrogen, magnesium and calcium in rainwater. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1026* (1-2), 191-194.
76. Nesterenko, P. N.; Shaw, M. J.; Hill, S. J.; Jones, P. Aminophosphonate-functionalized silica: A versatile chromatographic stationary phase for high-performance chelation ion chromatography. *Microchemical Journal* **1999**, *62* (1), 58-69.
77. Nesterenko, P. N.; Shpigun, O. A. High-performance chelation chromatography of metal ions on sorbents with grafted iminodiacetic acid. *Russian Journal of Coordination Chemistry* **2002**, *28* (10), 726-735.
78. Shaw, M. J.; Hill, S. J.; Jones, P.; Nesterenko, P. N. Determination of uranium in environmental matrices by chelation ion chromatography using a high performance substrate dynamically modified with 2,6-pyridinedicarboxylic acid. *Chromatographia* **2000**, *51* (11-12), 695-700.
79. Shaw, M. J.; Hill, S. J.; Jones, P.; Nesterenko, P. N. High-performance chelation ion chromatography of transition and heavy metal ions on polystyrene-divinylbenzene resin dynamically modified with 4-chlorodipicolinic acid. *Analytical Communications* **1999**, *36* (11-12), 399-401.
80. Hatsis, P.; Lucy, C. A. Improved sensitivity and characterization of high-speed ion chromatography of inorganic anions. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (4), 995-1001.
81. Tria, J.; Haddad, P. R.; Nesterenko, P. N. Determination of aluminium using high performance chelation ion chromatography. *Journal of Separation Science* **2008**, *31* (12), 2231-2238.
82. Bashir, W.; Paull, B. Determination of trace alkaline earth metals in brines using chelation ion chromatography with an iminodiacetic acid bonded silica column. *Journal of Chromatography A* **2001**, *907* (1-2), 191-200.
83. Lu, H. T.; Yin, X. Z.; Mou, S. F.; Riviello, J. M. Simultaneous determination of heavy and transition metals in biological samples by chelation ion chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2000**, *23* (13), 2033-2045.
84. Blazewicz, A.; Swieboda, R.; Kocjan, R. Investigations of retention behaviour of heavy metal ions on chelating stationary phase containing calconcarboxylic acid. *Chemia Analityczna* **2006**, *51* (2), 307-318.
85. Bonn, G.; Reiffenstuhl, S.; Jandik, P. Ion chromatography of transition-metals on an imino-diacetic acid bonded stationary phase. *Journal of Chromatography* **1990**, *499*, 669-676.

86. Bashir, W.; Paull, B. Ionic strength, pH and temperature effects upon selectivity for transition and heavy metal ions when using chelation ion chromatography with an iminodiacetic acid bonded silica gel column and simple inorganic eluents. *Journal of Chromatography A* **2002**, 942 (1-2), 73-82.
87. Barron, L.; O'Toole, M.; Diamond, D.; Nesterenko, P. N.; Paull, B. Separation of transition metals on a poly-iminodiacetic acid grafted polymeric resin column with post-column reaction detection utilising a paired emitter-detector diode system. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1213 (1), 31-36.
88. Nesterenko, P. N.; Jones, P. Single-column method of chelation ion chromatography for the analysis of trace metals in complex samples. *Journal of Chromatography A* **1997**, 770 (1-2), 129-135.
89. Jones, P.; Nesterenko, P. N. Use of complexing reagents as additives to the eluent for optimization of separation selectivity in high-performance chelation ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1213 (1), 45-49.
90. Hajos, P. Histidine as a dipolar eluent component in cation chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, 789 (1-2), 141-148.
91. Hajos, P.; Szikszay, E. Histidine as a dipolar eluent component in cation chromatography II. Prediction of retention data for alkaline and alkaline-earth ions. *Journal of Chromatography A* **2001**, 920 (1-2), 23-30.
92. Hajos, P.; Horvath, K.; Conca, R.; Sarzanini, C. Histidine as a dipolar eluent in ion chromatography of aliphatic amines. *Chromatographia* **2002**, 56, S103-S107.
93. Bose, R.; Saari-Nordhaus, R.; Sonaike, A.; Sethi, D. S. New suppressor technology improves the ion chromatographic determination of inorganic anions and disinfection by-products in drinking water. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1039 (1-2), 45-49.
94. Douglas, D. R.; Saari-Nordhaus, R.; Despres, P.; Anderson, J. M. New suppressor technology improves trace level anion analysis with carbonate-hydrogencarbonate mobile phases. *Journal of Chromatography A* **2002**, 956 (1-2), 47-51.
95. Haddad, P. R.; Jackson, P. E.; Shaw, M. J. Developments in suppressor technology for inorganic ion analysis by ion chromatography using conductivity detection. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000 (1-2), 725-742.
96. Hu, R. Z.; Weng, Y. H.; Lai, L. M.; Chen, J. C.; Lin, Q. Electrochemically generated multifunctional suppressor for ion chromatography. *Chromatographia* **2003**, 57 (7-8), 471-474.

97. Saari-Nordhaus, R.; Anderson, J. M. Electrochemically regenerated ion suppressors, new suppressors for ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, 782 (1), 75-79.
98. Saari-Nordhaus, R.; Anderson, J. M. Recent advances in ion chromatography suppressor improve anion separation and detection. *Journal of Chromatography A* **2002**, 956 (1-2), 15-22.
99. Sedyohutomo, A.; Lim, L. W.; Takeuchi, T. Development of packed-column suppressor system for capillary ion chromatography and its application to environmental waters. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1203 (2), 239-242.
100. Ullah, S. M. R.; Adams, R. L.; Srinivasan, K.; Dasgupta, P. K. Asymmetric membrane fiber-based carbon dioxide removal devices for ion chromatography. *Analytical Chemistry* **2004**, 76 (23), 7084-7093.
101. LaCourse, W. R. Pulsed electrochemical detection at noble metal electrodes in high performance liquid chromatography. *Analisis* **1993**, 21 (4), 181-195.
102. Vidotti, M.; Cerri, C. D.; Carvalhal, R. F.; Dias, J. C.; Mendes, R. K.; de Torresi, S. I. C.; Kubota, L. T. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2009**, 636 (1-2), 18-23.
103. Xu, Q.; Xu, C.; Wang, Y. P.; Zhang, W.; Jin, L. T.; Tanaka, K.; Haraguchi, H.; Itoh, A. Amperometric detection studies of poly-o-phenylenediamine film for the determination of electroinactive anions in ion-exclusion chromatography. *Analyst* **2000**, 125 (8), 1453-1457.
104. Xu, Q.; Zhang, S.; Zhang, W.; Jin, L. T.; Tanaka, K.; Haraguchi, H.; Itoh, A. Amperometric detection studies of Nafion/indium hexacyanoferrate film for the determination of electroinactive cations in ion chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 367 (3), 241-245.
105. Xu, Q.; Xu, C.; Wang, Q. J.; Tanaka, K.; Toada, H.; Zhang, W.; Jin, L. T. Application of a single electrode, modified with polydiphenylamine and dodecyl sulfate, for the simultaneous amperometric determination of electro-inactive anions and cations in ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 997 (1-2), 65-71.
106. Baldwin, R. P.; Thomsen, K. N. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection - A review. *Talanta* **1991**, 38 (1), 1-16.
107. Jones, P. Major sensitivity improvements in ion chromatography determinations involving post-column spectrophotometric reaction detectors through elimination of pump noise using a dual wavelength monitoring procedure. *Analyst* **2000**, 125 (5), 803-806.

108. Bruno, P.; Caselli, M.; Daresta, B. E.; de Gennaro, G.; de Pinto, V.; Ielpo, P.; Placentino, C. M. Method for the determination of Cu(II), Ni(II), Co(II), Fe(II), and Pd(II) at ppb/subppb levels by ion chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2007**, *30* (4), 477-487.
109. Wang, M.; Lin, J. M.; Qu, F.; Shan, X. Q.; Chen, Z. L. On-capillary complexation of metal ions with 4-(2-thiazolylazo)resorcinol in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1029* (1-2), 249-254.
110. Gautier, E. A.; Gettar, R. T.; Servant, R. E.; Batistoni, D. A. Surfactant-sensitized post-column reaction with xylenol orange for the determination of lanthanides by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, *770* (1-2), 75-83.
111. Teixeira, L. S. G.; Brasileiro, J. F.; Borges, M. M.; Cordeiro, P. W. L.; Rocha, S. A. N.; Costa, A. C. S. Determinação espectrofotométrica simultânea de cobre e ferro em álcool etílico combustível com reagentes derivados da ferroína. *Química Nova* **2006**, *29* (4), 741-745.
112. Gotoh, S.; Teshima, N.; Sakai, T.; Ida, K.; Ura, N. Flow-injection simultaneous determination of copper and iron in patient sera with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)aniline and its application to disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *499* (1-2), 91-98.
113. Ozcan, O.; Gulpepe, M.; Pcolu, O. M.; Cakir, E. A new sensitive automated colorimetric method for urine copper determination by using 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino) phenol (Nitro-PAPS) as a ligand. *Clinical Chemistry* **2006**, *52* (6), E58.
114. Yamane, T.; Yamaguchi, Y. 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenol as a new analytical reagent for flow-injection spectrophotometric determination of trace vanadium(V). *Mikrochimica Acta* **1998**, *130* (1-2), 111-115.
115. Yamane, T.; Yamaguchi, Y. Complex formation of 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfo-propylamino)phenol with lead, cadmium and manganese for their sensitive spectrophotometric detection in flow injection and ion chromatography systems. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *345* (1-3), 139-146.
116. Beauchemin, D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (12), 2873-2893.
117. Seubert, A. On-line coupling of ion chromatography with ICP-AES and ICP-MS. *Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20* (6-7), 274-287.
118. Gnansounou, E.; Dauriat, A.; Villegas, J.; Panichelli, L. Life cycle assessment of biofuels: Energy and greenhouse gas balances. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (21), 4919-4930.

119. Davis, S. C.; Anderson-Teixeira, K. J.; DeLucia, E. H. Life-cycle analysis and the ecology of biofuels. *Trends in Plant Science* **2009**, *14* (3), 140-146.
120. Gnansounou, E.; Dauriat, A. Ethanol fuel from biomass: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research* **2005**, *64* (11), 809-821.
121. Lin, C. Y. C. Biofuels for transport: Global potential and implications for sustainable energy and agriculture. *American Journal of Agricultural Economics* **2009**, *91* (4), 1155-1157.
122. Resolução ANP N° 36 de 6/12/2005 - DOU 7/12/2005 - Especificações do álcool etílico anidro combustível (AEAC) e do álcool etílico hidratado combustível (AEHC). 2005.
123. Rosillo-Calle, F.; Bajay, S. V.; Rothman, H. *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira*; Editora da Unicamp: Campinas, 2005.
124. de Oliveira, M. F.; Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; Fernandes, A. P.; Moraes, M.; Stradiotto, N. R. Simultaneous determination of zinc, copper, lead, and cadmium in fuel ethanol by anodic stripping voltammetry using a glassy carbon-mercury-film electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *380* (1), 135-140.
125. Goldemberg, J. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels* **2008**, *1*.
126. de Oliveira, F. S.; Korn, M. Spectrophotometric determination of sulphate in automotive fuel ethanol by sequential injection analysis using dimethylsulphonazo(III) reaction. *Talanta* **2006**, *68* (3), 992-999.
127. Cavalcanti, E.; Wanderley, V. G.; Miranda, T. R. V.; Uller, L. The effect of water, sulfate and pH on the corrosion behavior of carbon-steel in ethanolic solutions. *Electrochimica Acta* **1987**, *32* (6), 935-937.
128. de Oliveira, M. F.; Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; Stradiotto, N. R. Analytical methods employed at quality control of fuel ethanol. *Energy & Fuels* **2009**, *23*, 4852-4859.
129. de Paula, D. T.; Yamanaka, H.; de Oliveira, M. F.; Stradiotto, N. R. Determination of chloride in fuel ethanol using a polyaniline-chemically modified electrode in flow injection analysis. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils* **2008**, *44* (6), 435-440.
130. Munoz, R. A. A.; Richter, E. M.; de Jesus, D. P.; do Lago, C. L.; Angnes, L. Determination of inorganic ions in ethanol fuel by capillary electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2004**, *15* (4), 523-526.
131. Ambrozin, A. R. P.; Kuri, S. E.; Monteiro, M. R. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. *Química Nova* **2009**, *32* (7), 1910-1916.

132. ABNT NBR 11331 - Álcool etílico - Determinação da concentração de ferro e cobre - Método da espectrofotometria de absorção atômica. 2007.
133. Munoz, R. A. A.; Angnes, L. Simultaneous determination of copper and lead in ethanol fuel by anodic stripping voltammetry. *Microchemical Journal* **2004**, 77 (2), 157-162.
134. Taylor, D. B.; Synovec, R. E. Chromatographic determination of copper speciation in jet fuel. *Talanta* **1993**, 40 (4), 495-501.
135. ABNT NBR 10894 - Álcool etílico - Determinação da concentração de cloreto e sulfato - Método da cromatografia de íons. 2007.
136. Popa, E.; Iordache, O. Dynamics of nitrogen-bound fuel conversion to nitrogen oxides by biomass combustion. *Revue Roumaine des Sciences Techniques-Serie Electrotechnique et Energetique* **2007**, 52 (1), 121-128.
137. Normann, F.; Andersson, K.; Leckner, B.; Johnsson, F. High-temperature reduction of nitrogen oxides in oxy-fuel combustion. *Fuel* **2008**, 87 (17-18), 3579-3585.
138. Okumura, L. L. Desenvolvimento de método para determinação de acetaldeído em álcool etílico hidratado combustível por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
139. Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; de Oliveira, M. F.; Zanoni, M. V. B.; Stradiotto, N. R. Determination of aldehydes and ketones in fuel ethanol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatographia* **2006**, 63 (1-2), 45-51.
140. Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; de Oliveira, M. F.; Zanoni, M. V. B.; Stradiotto, N. R. Determination of acetaldehyde in fuel ethanol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Sciences* **2005**, 21 (4), 441-444.
141. Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; de Oliveira, M. F.; Zanoni, M. V. B.; Stradiotto, N. R. Rapid and sensitive method for the determination of acetaldehyde in fuel ethanol by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 381 (8), 1619-1624.
142. ASTM D4806 - Standard specification for denatured fuel ethanol for blending with gasolines for use as automotive spark-ignition engine fuel. 2009.
143. ASTM D5798 - Standard specification for fuel ethanol (Ed75-Ed85) for automotive spark-ignition engines. 2009.

144. EN 15376:2007+A1:2009 - Automotive fuels - Ethanol as a blending component for petrol - Requirements and test methods. 2009.
145. Sulak, M.; Smogrovicova, D. Bioethanol: Current trends in research and practice. *Chemicke Listy* **2008**, *102* (2), 108-115.
146. ABNT NBR 10895 - Álcool etílico - Determinação do teor de íon cloreto por técnica potenciométrica - Método de ensaio. 1990.
147. ASTM D7319 - Standard test method for determination of total and potential sulfate and inorganic chloride in fuel ethanol by direct injection suppressed ion chromatography. 2009.
148. EN 15492 - Ethanol as a blending component for petrol - Determination of inorganic chloride and sulfate content - Ion chromatographic method. 2008.
149. EN 15484 - Ethanol as a blending component for petrol - Determination of inorganic chloride - Potentiometric method. 2007.
150. ABNT NBR 12120 - Álcool etílico - Determinação do teor de sulfato por volumetria - Método de ensaio. 1991.
151. ABNT NBR 10422 - Álcool etílico - Determinação da concentração de sódio - Método da fotometria de chama. 2007.
152. ABNT NBR 10893 - Álcool etílico - Determinação do teor de cobre por espectrofotometria de absorção atômica. 1990.
153. ASTM D1688 - Standard test methods for copper in water. 2007.
154. EN 15488 - Ethanol as a blending component for petrol - Determination of copper content - Graphite furnace atomic absorption spectrometric method. 2007.
155. Pereira, E. A.; Tavares, M. F. M.; Stevanato, A.; Cardoso, A. A. Avaliação de contaminantes inorgânicos e orgânicos em álcool combustível utilizando eletroforese capilar. *Química Nova* **2006**, *29* (1), 66-71.
156. Pereira, E. A.; Stevanato, A.; Cardoso, A. A.; Tavares, M. F. M. Indirect determination of chloride and sulfate ions in alcohol fuel by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *380* (1), 178-182.
157. Teixeira, L. S. G.; Chaves, T. J.; Guimaraes, P. R. B.; Pontes, L. A. M.; Teixeira, J. S. R. Indirect determination of chloride and sulfate ions in ethanol fuel by X-ray fluorescence after a precipitation procedure. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *640* (1-2), 29-32.

158. Ferreira, H. B. P.; de Lima, T. A. F.; Barbeira, P. J. S. Voltammetric determination of chloride ion in automotive fuel ethanol. *Electroanalysis* **2008**, *20* (4), 390-395.
159. da Silva, E. L.; Budziak, D.; Carasek, E. Determination of trace metals in fuel alcohol by FAAS using Nb₂O₅-SiO₂ as sorbent material in a flow injection on-line preconcentration system. *Analytical Letters* **2004**, *37* (9), 1909-1924.
160. Giacomelli, M. B. O.; da Silva, J. B. B.; Saint'Pierre, T. D.; Curtius, A. J. Use of iridium plus rhodium as permanent modifier to determine As, Cd and Pb in acids and ethanol by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* **2004**, *77* (2), 151-156.
161. Saint'Pierre, T. D.; Maranhao, T. D.; Frescura, V. L.; Curtius, A. J.; Aucelio, R. Q. Determination of Cd and Pb in fuel ethanol by filter furnace electrothermal atomic absorption spectrometry. *Química Nova* **2008**, *31* (7), 1626-1630.
162. Saint'Pierre, T. D.; Tormen, L.; Frescura, V. L. A.; Curtius, A. J. The direct analysis of fuel ethanol by ICP-MS using a flow injection system coupled to an ultrasonic nebulizer for sample introduction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2006**, *21* (11), 1340-1344.
163. Saint'Pierre, T. D.; Frescura, V. L. A.; Curtius, A. J. The development of a method for the determination of trace elements in fuel alcohol by ETV-ICP-MS using isotope dilution calibration. *Talanta* **2006**, *68* (3), 957-962.
164. Amorim Filho, V. R.; Caldas, N. M.; Raposo Júnior, J. L.; Flumignan, D. L.; de Oliveira, J. E.; Gomes Neto, J. A. Simultaneous determination of Ba, Cr, Mo (Group 1), and Cu, Fe, Ni, and Pb (Group 2) in commercial fuel ethanol by graphite furnace AAS. *Atomic Spectroscopy* **2008**, *29* (6), 230-235.
165. de Oliveira, M. F.; Balbo, V. R.; de Andrade, J. F.; Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; Stradiotto, N. R. Quantitative assay of copper, iron, nickel, and zinc in fuel ethanol samples by flame atomic absorption spectrometry. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils* **2008**, *44* (6), 430-434.
166. Roldan, P. S.; Alcantara, I. L.; Castro, G. R.; Rocha, J. C.; Padilha, C. C. F.; Padilha, P. M. Determination of Cu, Ni, and Zn in fuel ethanol by FAAS after enrichment in column packed with 2-aminothiazole-modified silica gel. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *375* (4), 574-577.
167. Teixeira, L. S. G.; Bezerra, M. D.; Lemos, V. A.; dos Santos, H. C.; de Jesus, D. S.; Costa, A. C. S. Determination of copper, iron, nickel, and zinc in ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry using on-line preconcentration system. *Separation Science and Technology* **2005**, *40* (12), 2555-2565.

168. de Oliveira, A. P.; de Moraes, M.; Neto, J. A. G.; Lima, E. C. Simultaneous determination of Al, As, Cu, Fe, Mn, and Ni in fuel ethanol by GFAAS. *Atomic Spectroscopy* **2002**, *23* (2), 39-43.
169. de Oliveira, A. P.; de Moraes, M.; Neto, J. A. G.; Lima, E. C. Direct determination of Al, As, Cu, Fe, Mn, and Ni in fuel ethanol by simultaneous GFAAS using integrated platforms pretreated with W-Rh permanent modifier together with Pd plus Mg modifier. *Atomic Spectroscopy* **2002**, *23* (6), 190-195.
170. Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Padilha, P. M.; Stradiotto, N. R. Copper determination in ethanol fuel by differential pulse anodic stripping voltammetry at a solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica. *Talanta* **2007**, *71* (2), 771-777.
171. Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Medeiros, M. J.; Stradiotto, N. R. Copper determination in ethanol fuel samples by anodic stripping voltammetry at a gold microelectrode. *Microchimica Acta* **2009**, *164* (1-2), 101-106.
172. da Silva, J. E.; da Silva, F. A.; Pimentel, M. F.; Honorato, R. S.; da Silva, V. L.; Montenegro, B. S. M.; Araujo, A. N. A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2006**, *70* (3), 522-526.
173. Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Padilha, P. M.; Stradiotto, N. R. A solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica for differential pulse adsorptive stripping analysis of nickel in ethanol fuel. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *584* (2), 295-301.
174. de Oliveira, M. F.; Saczk, A. A.; Okumura, L. L.; Stradiotto, N. R. Determinação de zinco em álcool combustível por voltametria de redissolução anódica. *Eclética Química* **2002**, *27*, 153-160.
175. Bag, S. P.; Freiser, H.; Fernando, Q. Influence of metal chelation on structure of chelidamic acid. *Inorganic Chemistry* **1962**, *1* (4), 887-&.
176. Lide, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*; 84th ed.; CRC Press: Boca Raton, 2004.
177. Phenomenex Catalog International - HPLC, GC, SPE - Chromatography product guide 09/10. [Appendices - Reversed Phase Method Development - p. 382]. 2009.
178. Anderegg, G. Pyridinderivate als Komplexbildner .1. Pyridincarbonsauren. *Helvetica Chimica Acta* **1960**, *43* (1), 414-424.
179. Anderegg, G. Pyridinderivate als Komplexbildner .2. Komplexbildung des dreiwertigen Eisen-Ions mit Pyridincarbonsauren. *Helvetica Chimica Acta* **1960**, *43* (6), 1530-1545.

180. Anderegg, G. Pyridinderivate als Komplexbildner .4. Die Metallkomplexe der Chelidamsaure. *Helvetica Chimica Acta* **1963**, 46 (3), 1011-&.
181. Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical stability constants*; Plenum Press: New York, 1974; Vol. 1: Amino Acids.
182. Norkus, E.; Stalnioniene, I.; Crans, D. C. Interaction of pyridine- and 4-hydroxypyridine-2,6-dicarboxylic acids with heavy metal ions in aqueous solutions. *Heteroatom Chemistry* **2003**, 14 (7), 625-632.
183. INMETRO - DOQ-CGCRE-008 - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. 2003.
184. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*; 6 ed.; Brooks Cole: Belmont, 2007.
185. Krull, I. S.; Swartz, M. Analytical method development and validation for the academic researcher. *Analytical Letters* **1999**, 32 (6), 1067-1080.
186. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* **2002**, 74 (5), 835-855.
187. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27 (5), 771-780.
188. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova* **2006**, 29 (2), 338-350.
189. Majumdar, A. K.; Bag, S. P. Spectrophotometric determination of iron with chelidamic acid. *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie* **1962**, 185 (6), 435-439.
190. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; 2nd ed.; John Wiley: New York, 1979.
191. Gomes, L. A. M.; Padilha, P. M.; Moreira, J. C.; Dias Filho, N. L.; Gushikem, Y. Determination of metal ions in fuel ethanol after preconcentration on 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol modified silica gel. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1998**, 9 (5), 494-498.