

Desenvolvimento de metodologia para especiação de cromo em amostras de águas por eletroforese capilar de zona

R.M. Santos, L.C. Santos, E.S. Souza, C.T.S. Nunes e A.P.G. Gervasio

*Universidade Federal de Sergipe - Campus Prof. Alberto Carvalho
Departamento de Química, Itabaiana SE CEP 49500-000.*

gervasio@ufs.br

(Recebido em 30 de outubro de 2009; aceito em 30 de novembro de 2009)

Existem muitas técnicas que podem ser empregadas para determinação de metais em amostras ambientais. No entanto, especiação de metal está tornando-se uma das etapas mais complicadas de se realizar em química analítica, uma vez que é importante definir nível toxicológico de metais em diferentes estados de oxidação para o ambiente. A aplicação da eletroforese capilar de zona (CZE) tem aumentado como excelente ferramenta para estudar e quantificar espécies de metais. Nessa pesquisa, propõe-se um desenvolvimento de um sistema de Eletroforese capilar de Zona (CZE) para a determinação e especiação de metais em amostras de águas. O trabalho enfatiza a importância dos métodos de especiação em química para resolver problemas importantes tais como a determinação de metais em amostras de águas. O sistema proposto foi avaliado para a especiação de Cr(VI), Cr(III)-EDTA e Fe(III)-EDTA em água do Açude da Marcela e do Curtume, localizados em Itabaiana/SE.

Palavras-chave: metal, especiação, amostras de água, eletroforese capilar.

There are many techniques can be used to metals determination in environmental samples. Nevertheless metal speciation has become the more complicated step to improve in analytical chemistry, since knowledge about toxicological level of metals in different oxidation state is important to environmental. The application of capillary electrophoresis of zone (CZE) is growing as excellent tool to study and quantify species of metals. In this research, we propose a development of CZE system to speciation and determination of metals in water samples. The proposed system was tested for speciation of Cr(VI), Cr(III)-EDTA and Fe(III)-EDTA in water samples collected in Açude da Marcela and in a Tannery, both located in Itabaiana SE.

Keywords: metal, speciation, water sample, capillary electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

A especiação de metais em águas naturais é de interesse e importância para se conhecer a sua biodisponibilidade e mobilidade e seu comportamento biogeoquímico, além de se conhecer o impacto da contaminação de metais sobre o ambiente, e principalmente os efeitos toxicológicos. Neste aspecto, estudos mostram que as propriedades toxicológicas dos metais são totalmente dependentes sobre a forma química no qual eles ocorrem na natureza. A especiação auxilia no desenvolvimento de estratégias de controle, prevenção e descontaminação do metal poluente. No caso de amostras de águas, por exemplo, o monitoramento da distribuição das espécies metálicas auxilia no controle de processos industriais. Do ponto de vista biológico, conhecer o papel de metais traços nos organismos vivos é importante para compreender funções biológicas, tais como a complexação de metais por proteínas.

A análise de metais enfocando a especiação de metais tem sido de interesse de pesquisadores, com muitos trabalhos publicados [1-14]. Neste aspecto, não se pode deixar de relatar a importância do desenvolvimento de técnicas analíticas para a análise de metais traços em uma variedade significativa de matrizes. Vale ressaltar a hifenação de técnicas, importantes para resolver problemas relacionados à sensibilidade analítica. Com relação aos métodos de separação, estes ocupam lugar de destaque quando se trata de especiação, mas não se pode descartar as baixas sensibilidades conseguidas pelos métodos espectrométricos tais como aqueles que utilizam os detectores de massa (p.ex. ICP-MS) [16]. Pode-se encontrar na literatura trabalhos que envolvem especiação de metais, em variadas matrizes, empregando os métodos

cromatográficos tal como a cromatografia líquida de alta eficiência e os métodos eletroforéticos [2]. Neste último caso, é importante ressaltar a eletroforese capilar (do inglês: Capillary electrophoresis, CE). Muitos trabalhos são encontrados na literatura mostrando estudos focalizados na otimização dos parâmetros de separação para a determinação de metais em amostras ambientais, biológicas e industriais, com vários tipos de detectores. Os detectores UV-Vis ainda são os mais utilizados, isto possivelmente devido a alta capacidade dos sistemas espectrofotométricos e o custo.

O modo de separação em eletroforese capilar é baseado na diferença das razões carga/raio de solutos iônicos, os quais incluem, dentre outros, ânions e cátions inorgânicos, ácidos e aminas orgânicos. A separação é obtida em colunas capilares entre 25 e 100 microns diâmetro interno. A coluna é cheia com um eletrólito adequado para a separação. A migração é obtida aplicando um campo elétrico fornecido por uma fonte de alta voltagem. Diferentes modos de eletroforese são possíveis [18,19]. O mais utilizado é o modo de solução livre ou eletroforese capilar de zona (CZE ou CE), onde a mobilidade iônica das espécies tem influência significativa na separação. O emprego de baixos volumes de amostras e reagentes e a poderosa capacidade de separação da eletroforese capilar faz desta técnica uma importante aliada à chamada química verde.

Em relação à especiação e determinação de metais em amostras de águas, é de interesse conhecer a forma da espécie metálica presente em solução de amostras. Neste aspecto, é possível encontrarmos metais em sua forma livre ou complexada. No último caso, a interação com matéria orgânica tal como substância húmica ou outras macromoléculas foram comprovadamente identificadas [2].

Em eletroforese capilar, a resolução depende da mobilidade eletroforética dos solutos e do fluxo eletroosmótico (EOF). Estes, por sua vez, podem ser modificados variando-se a natureza, a concentração e o pH do tampão. Na otimização dos sistemas eletroforéticos, é importante avaliar o pH da solução eletrolítica bem como sua natureza e concentração. No estudo da influência do pH sobre a eficiência de separação de metais em amostras de águas, o pH da solução tampão tem uma grande influência sobre o fluxo eletroosmótico porque altera o potencial zeta. O fluxo eletroosmótico se forma devido à parede do capilar ser de sílica fundida. O potencial zeta (ξ) é a diferença de potencial entre as duas camadas elétricas formadas devido à ionização dos grupos silanóis e é proporcional à quantidade de cargas na superfície do capilar. À medida que o pH aumenta o fluxo eletroosmótico também aumenta porque, primariamente, ocorre um maior número de dissociações dos grupos silanóis, os quais passam de Si-OH para Si-O⁻ nas paredes internas do capilar. Portanto, em valores mais altos de pH, um maior número de grupos silanóis é ionizado fazendo com que haja um aumento do potencial zeta e, por consequência, um aumento da velocidade do fluxo eletroosmótico. Já em valores mais baixos de pH, ocorre uma diminuição do fluxo eletroosmótico porque há uma diminuição do potencial zeta em função do menor número de ionizações [18,19].

Como discutido anteriormente, a mobilidade dos solutos pode ser modificada pela adição de agentes complexantes. No caso de metais, a adição de agentes complexantes como os ácidos tartárico, oxálico ou EDTA alteram significativamente a mobilidade iônica dos metais. Isso é, na verdade, explorado para otimização da separação de metais cuja mobilidade é muito próxima [12]. Essa estratégia foi empregada por Motellier e Decambox que avaliaram a separação de metais alcalinos em matriz com alto teor de sódio. O tampão composto por ácido acético/acetato pH 5,00 foi empregado para separação. Adicionalmente, o agente complexante era adicionado ao tampão. Foram avaliados vários ácidos orgânicos, sendo o ácido oxálico utilizado para a determinação de metais em amostras de água com alto teor de sódio [1]. Os autores obtiveram limite de detecção de 4 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio e magnésio em presença de 500 mg/L de sódio. Outras características foram: 25 nL de volume de amostra, 25 kV para a separação e detecção a 214 nm e coluna com 75 μm e 60 cm comprimento (52,5 cm comprimento efetivo). A matriz da amostra pode causar interferências, e no caso do CE, a força iônica e pH alteram a migração eletroforética [11].

Manninen e Pantsar [10] também empregaram um detector UV em 214 nm para a determinação de Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+} e Na^{+} em amostras de água. Os autores empregaram solução de separação contendo 5 mmol/L de imidazol pH 4,1 e avaliaram a natureza e a concentração dos agentes complexantes: ácido hidroxiiisobutírico (HIBA) e éter coroa. Para separação com 20 kV,

50 μm e 60 cm de comprimento de coluna (55 até o detector) e 15 s de injeção empregando injeção por gravidade, os autores obtiveram limite de detecção de 0,4; 0,2; 0,2 e 0,1 mg/L para K^+ , Ca^{+2} , Na^+ e Mg^{+2} respectivamente.

Liu e colaboradores [14] empregaram a eletroforese capilar e avaliaram o efeito de aditivos orgânicos sobre a separação dos complexos. Os autores estudaram a separação de Ru^{+3} , Rh^{+3} , Os^{+4} e Co^{+2} complexados com resorcinol (TAR). A solução tampão foi 0,2 mol/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/0,2 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$. A complexação ocorreu pré-análise, mas o agente complexante também foi adicionado ao tampão. A separação foi obtida em 20 minutos com limite de detecção de 92, 294, 843 e 510 ng/mL para Co^{+2} , Ru^{+3} , Rh^{+3} , Os^{+4} respectivamente.

Por outro lado, a eletroforese capilar também pode ser utilizada para a análise de compostos orgânicos normalmente utilizados para otimizar a separação de metais. Owens e colaboradores [8] determinaram ácidos aminocarboxílicos e seus complexos com metais por CE. Os autores avaliaram a relação metal/ligante analisando os eletroferogramas obtidos com misturas de ambos. Foi possível determinar a concentração de metal complexado bem como a molécula de ligante livre em uma única corrida. O estudo foi realizado empregando UV a 185nm, 75 μm e 60cm de comprimento de coluna (52,5 até o detector), 25 mmol/L tampão fosfato/0,5 mmol/L de TTAB como inversor de fluxo eletroosmótico, 20 kV de voltagem de separação e 30 s de injeção por gravidade. Os autores estudaram os complexos de Ca^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} e Fe^{+3} .

Recentemente, Laamanen e Matilainen também mostraram um estudo mais abrangente sobre o efeito dos agentes complexantes na resolução e especiação de metais [7]. Com relação ainda à complexação de metais, Kamarkar [9] recentemente publicou um trabalho avaliando a separação de complexos de metálicos com cianeto em águas por cromatografia.

Outra aplicação em amostra de água pode-se citar o trabalho de Fukushi e colaboradores [6] que determinaram amônio em água de rio por eletroforese capilar com detecção UV a 190 nm. Os autores empregaram tampão borato a pH 10, coluna de 100 μm e 72 cm de comprimento de coluna (50 até o detector). O limite de detecção foi de 0,24 mg/L e tempo de análise de ~7 min.

Neste trabalho, foram estudadas todas as variáveis inerentes ao sistema a fim de estabelecer as melhores condições de análise da metodologia e posteriormente, identificar e quantificar a presença de metais Cr(III), Cr(VI) e Fe(III) em amostras de águas coletadas no Açude da Marcela e amostras de Água de um Curtume, situados em Itabaiana-SE. Além de mostrar o emprego da radiação microondas na etapa de complexação das soluções de referência e amostras reais, utilizando um equipamento caseiro.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais e Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho:

- CE LabInstruments modelo 200 equipado com detector UV-Vis.
- Capilar de sílica fundida (Polymicro) com diâmetro interno 75 μm e externo de 375 μm , sem recobrimento interno e comprimentos variados.
- Frascos com solução de eletrólito.
- Estação Cromatográfica (Data Apex Ltda, USA).
- Fonte de alta voltagem CZE 1000R (Spellman modelo CZE 30PN1000).
- Eletrodo de platina de pólo positivo e negativo.
- Suportes de madeira.
- Bomba peristáltica com 13 canais, Ismatec, modelo mp 13GJ-4.
- Phmetro Marconi, modelo PA200.
- Placa Aquecedora Vertex, modelo DB-II.

- Forno de microondas Panasonic, modelo NN-S62B Family, com potência máxima de 1000 W e frequência máxima de 2450 MHz.
- Balança analítica Celtac, modelo FA2104N.
- Vidrarias e outros materiais, comuns a um laboratório analítico.

2.2. Reagentes e Soluções

A água empregada na preparação da solução foi destilada por um sistema de destilador modelo 425 da marca Cientec.

- Solução estoque: 0,1 mol/L Cromo (III) a partir 5,3290 g do Cloreto de Cromo (CrCl_3) (Reagen), 0,1 mol/L Ferro (III) a partir 6,7575 g do sal Cloreto Férrico (Reagen).
- Solução padrão: 50,0 mg/L Cr(III) a partir de diluição da solução 0,1 mol/L CrCl_3 e 1000 mg/L Fe(III) a partir de diluição da solução 0,1 mol/L FeCl_3 . Estas soluções foram acidificadas adicionando 1 mL de HCl concentrado.
- Solução 50,0 mg/L de EDTA a partir 1,8612 g do sal dissódico $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck).
- Solução tampão pH 9,50 contendo: Fosfato de Amônio Dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ (Reagen) mais o inversor de fluxo 0,5 mmol/L Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (CTAB).
- Solução tampão 25,0 mmol/L pH 9,00 contendo: 0,1545 g Ácido Bórico (H_3BO_3) (Baker)
- Solução de Hidróxido de Sódio 1 mol/L e 0,1 mol/L (F. Maia).
- Solução de Ácido Clorídrico 1 mol/L (F. Maia).
- Soluções de referência:
 - 1- 0,2 a 1,0 mg/L Cr(III) e Cr(VI) preparadas após diluição da solução padrão 50,0 mg/L.
 - 2- 0,5 a 10 mg/L e 5,0 a 40,0 mg/L Fe(III) preparadas após diluição da solução padrão 1000 mg/L.
- Solução 1 mol/L de NaOH (F. Maia) para ajustar o pH.

2.3. Preparo da solução estoque e tampão

Todas as soluções foram preparadas diariamente com reagentes de grau analítico e dissolvidas na água destilada. As soluções de Cr(III) e Fe(III) foram diluídas para as concentrações necessárias antes do uso.

As soluções contendo Cr(III) eram preparadas adicionando-se uma quantidade conhecida de EDTA e, posteriormente, aquecida em chapa aquecedora a 100°C por 30 min. Também foi feito um estudo quanto ao uso da radiação microondas na aceleração da etapa de complexação do Cromo. Para isso, prepararam-se soluções de referências de Cr(III) + EDTA e variou-se o tempo de aquecimento entre 1 e 10 min e mantendo-se constante a potência de 700 W.

Para os experimentos, foram preparadas duas soluções tampão:

- a) 20,0 mmol/L fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,5 mmol/L de CTAB pH 9,50 para determinação de cromo e
- b) 25,0 mmol/L de ácido bórico (H_3BO_3) pH 9,00 para determinação de ferro.

Os valores de pH das soluções tampão eram ajustados com hidróxido de sódio 1,0 mol/L e, previamente ao uso, era filtrada com papel quantitativo 12,50 ± 0,10 cm antes de ser utilizado.

2.4. Pré-condicionamento e condicionamento do capilar

O capilar eletroforético é constituído de sílica fundida, e a parede revestida por grupos silanóis. Antes de iniciar as análises, o capilar de sílica era tratado sequencialmente com água destilada durante 2 min, ácido clorídrico 1mol/L (5min), água destilada novamente, hidróxido de sódio 0,1 mol/L (15 min) e, finalmente a coluna era condicionada com a solução eletrolítica

por 30 min. Entre uma análise e outra, para o condicionamento do capilar, utilizou-se a solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L e tampão (2 min).

2.5. Otimização das condições eletroforéticas para a separação do Cromo e Ferro

Para a identificação dos picos de Cr(VI), Cr(III)-EDTA⁻ e EDTA em função do tempo de migração foram utilizadas soluções individuais dos respectivos íons. Posteriormente, foram preparadas soluções mistas de Cr(III)-EDTA, Cr(VI) e Fe(III)-EDTA. Em todas as análises, a concentração de EDTA foi mantida constante em 30% maior que a concentração de cromo. Essa estratégia permitiu a determinação das duas espécies de cromo como formas aniônicas em uma única corrida. Além disso, foi feita a inversão do fluxo eletroosmótico com o CTAB para facilitar a determinação de ânions [18].

2.5.1 Método de injeção da amostra

Para a injeção da solução de referência no capilar eletroforético foram utilizados os modos de injeção hidrodinâmico e eletrocínético. No primeiro, o frasco contendo a solução a ser injetada era mantido a uma altura de 4,5 cm. Para o modo eletrocínético, o frasco contendo as soluções era colocado junto com o eletrodo e a fonte de alta voltagem era acionada por 25 s, sendo assim, como o método anterior, injetado várias vezes para verificar a magnitude do sinal e a resolução dos picos. Para este estudo empregaram-se soluções de cromo.

2.5.2 Estudo da diferença de potencial aplicado e concentração e pH da solução eletrolítica

Para definir a ddp que seria utilizada no estudo da concentração da solução tampão, realizaram-se medidas eletroforéticas variando-se a voltagem aplicada entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 kV.

Para o estudo da influência da concentração da solução eletrolítica, variou-se a concentração entre 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mmol/L, mantendo-se constante em 0,5 mmol/L a concentração do inversor de fluxo (CTAB), pH em 9,50 e 10 kV.

A influência do pH da solução tampão foi verificado variando-se o pH da solução tampão 20,0 mmol/L em 8,00; 8,50; 9,00 e 9,50. Para este estudo o potencial aplicado foi 10 kV.

As melhores condições de análise foram definidas em função da eficiência de separação, magnitude e precisão dos sinais analíticos.

2.5.3 Estudo do tempo de injeção

A influência do tempo de injeção, sobre a magnitude do sinal analítico e eficiência da separação das espécies de cromo, foi avaliada empregando injeção hidrodinâmica, por gravidade, e foi variado entre 1 e 30 s. Utilizou-se uma solução tampão 20,0 mmol/L pH 9,50 de fosfato de amônio dibásico e aplicou-se uma diferença de potencial de 10 kV.

2.5.4 Estudo da complexação empregando radiação microondas

A aplicação da energia de microondas foi realizada visando implementar a etapa de complexação, uma vez que essa reação é lenta a temperatura ambiente. Foram feitos alguns estudos para definir o tempo necessário para a complexação do Cr(III) com EDTA. Para definir o tempo de aquecimento foi feito um estudo variando-se o tempo de radiação sobre as amostras no forno microondas de 1 a 10 minutos na potência de 700 W. A solução empregada neste teste continha 1,0 mg/L de Cr(III) + 1,3 mg/L EDTA.

2.6. Otimização das condições eletroforéticas para a separação do Ferro

Foram preparadas soluções padrão de 0,2 a 1,2 mg/L a partir da diluição da solução estoque de Fe (III) e analisadas nos comprimentos de onda 190, 220, 225 e 254 nm. Baseando-se na literatura, e resultados experimentais obtidos neste trabalho, optou-se por trabalhar com comprimento de onda em 254 nm e utilizando tampão ácido bórico 50,0 mmol/L ou 25,0 mmol/L pH 9,0 [21]. As soluções de referência foram preparadas, a partir de solução estoque

1000 mg/L, nas concentrações 0,5 a 10,0 mg/L e de 10,0 a 40,0 mg/L e analisadas a 254 nm. A separação foi obtida em tampão contendo ácido bórico 25,0 mmol/L pH 9,00.

2.7. Curvas Analíticas

Para avaliar a etapa de otimização, para a separação e quantificação das espécies de cromo e ferro, construíram-se curvas analíticas para quantificação das espécies. Os gráficos e equações foram obtidos a partir da altura do pico *versus* concentração da solução de referência. Para determinação de cromo, as curvas foram preparadas com soluções mistas contendo entre 0,2 a 1,0 mg/L Cr(III) e Cr(VI), usando o forno microondas para complexação.

Para a quantificação de Fe(III)-EDTA empregaram-se duas curvas analíticas com concentração entre 0,5 a 10,0 mg/L e de 5,0 a 40,0 mg/L.

2.8. Coleta, preparo e análise das amostras de Águas do Açude e Curtume

As amostras a serem analisadas foram coletadas em frascos de polietileno de 5 L no Açude da Marcela e no reservatório da Indústria de Curtume situados em Itabaiana- SE e analisadas imediatamente. Após uso, as amostras eram guardadas em geladeira a 4°C.

Uma vez otimizadas as condições com soluções de referência, o sistema foi avaliado para a determinação em amostras reais. A água coletada foi imediatamente filtrada em duas etapas: na primeira, empregando um funil simples com duas folhas de papel de filtro qualitativo, na segunda foi filtrado em um papel de filtro quantitativo $12,50 \pm 0,10$ cm antes do uso por 3 vezes.

Foram selecionadas cinco amostras de 100 mL da Água do Açude que foram tratadas da seguinte maneira:

- 1- Uma amostra não recebeu nenhum reagente.
- 2- Uma amostra recebeu 1,3 mg/L EDTA,
- 3- Uma amostra recebeu 1,3 mg/L EDTA mais 1,0 mg/L Cr(III),
- 4- Uma amostra recebeu 1,0 mg/L Cr(VI)
- 5- E, finalmente, uma amostra foi tratada com 1,0 mg/L Cr(VI) + 1,0 mg/L Cr(III) + 1,3 mg/L EDTA.

Além da solução de referência, a amostra pura, a amostra com EDTA e a amostra com Cr(III)-EDTA foram levadas à chapa aquecedora até fervura por 30 min para realização do processo de complexação. Após o restabelecimento da temperatura ambiente, em uma das amostras com Cr(III) e EDTA foi adicionado Cr(VI), e imediatamente analisadas. Também foram preparadas soluções com concentrações maiores do que 1,0 mg/L de Cr(III) ou Cr(VI) mantendo-se o mesmo procedimento acima descrito. Para melhor avaliação também foram utilizadas soluções contendo concentrações com até 20,0mg/L de Cromo.

Também foram analisadas amostras pré-concentradas. Para isso, três alíquotas de 200 mL das Águas do Açude e Curtume foram acidificadas com 0,1 mL de HCl 0,01 mol/L e mantidas em chapa aquecedora para redução de volume. As amostras foram pré-concentradas reduzindo-se o volume de 200 mL de amostra para 80,0 mL empregando aquecimento em chapa aquecedora por aproximadamente 3h. Neste caso, dividiu-se o volume final das 3 amostras em duas porções cada. Para açude:

- a) 35,0 mL Água do Açude + 50,0 mg/L EDTA e
- b) 35,0 mL de Água do Açude + 50,0 mg/L EDTA + 0,5 mg/L Cr(III) + 0,5 mg/L Cr(VI),
e para curtume:
- c) 20,0 mL Água Curtume + 50,0 mg/L EDTA e
- d) 20,0 mL Água Curtume + 0,5 mg/L Cr(III) + 0,5 mg/L Cr(VI) + 50,0 mg/L EDTA.

O volume final dessas soluções foi mantido em 100 mL empregando água destilada. Além disso, essas amostras foram levadas ao forno microondas caseiro, até ebulição, por aproximadamente 3 minutos, para completar a etapa de complexação.

Para determinação de Ferro em Água do Açude e Curtume, os volumes finais obtidos das três amostras pré-concentradas foram divididos em duas porções cada:

- a) 30,0 mL Água Açude + 50,0 mg/L EDTA.

b) 30,0 mL Água Açude + 50,0 mg/L EDTA + 2,5 mg/L Fe(III).

Para determinação de Ferro em Água do Curtume:

a) 20,0 mL Água Curtume + 50,0 mg/L EDTA e

b) 20,0 mL Água Curtume + 50,0 mg/L EDTA + 10,0 mg/L Fe(III).

As amostras foram preparadas e diluídas a volume final 100 mL com água destilada.

2.9. Sistema eletroforético

O sistema eletroforético montado no laboratório é do tipo caseiro. Este consiste numa fonte de alta tensão, um capilar mergulhado em dois reservatórios contendo o eletrólito, eletrodos de platina e um detector UV, uma bomba peristáltica para facilitar o condicionamento do capilar, além de um computador com software para aquisição de dados. O diagrama esquemático do sistema é mostrado Figura 1.

O condicionamento do capilar era feito bombeando H₂O, HCl por 2 minutos, H₂O, NaOH por 15 minutos e solução tampão por 30 minutos com o auxílio de uma bomba peristáltica. Entre as injeções, a coluna era pré-condicionada com solução tampão por 2 min. O capilar utilizado era de sílica fundida com diâmetro interno de 75 µm e comprimento total 51 cm (31 cm da injeção até o detector). A injeção era feita por modo hidrodinâmico mantendo-se os frascos de amostra e solução referência 4,5 cm de altura por 30s. A detecção *on column* foi feita com um detector UV. Para a determinação de cromo e ferro, a injeção era feita no pólo negativo da fonte uma vez que todas as espécies eram aniônicas, ou seja, Cr(III) e Fe(III) eram complexados com EDTA, e o anion Cr(VI). A repetibilidade das medidas em função do tempo de migração e altura de sinal foi avaliada mediante injeções consecutivas, para 3 ou 10 injeções, de uma solução contendo os analitos.

A identificação dos picos, referente às espécies estudadas, foi feita comparando-se o espectro UV com as soluções de referências.

Empregando o sistema, foram avaliados os principais parâmetros envolvidos em CE: tempo de injeção, concentração dos analitos, concentração, natureza e pH do tampão e diferença de potencial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Método de injeção de amostra

Para definir o modo de injeção, as soluções de referência foram injetadas empregando o modo hidrodinâmico e o eletrocínético. No primeiro caso, a injeção foi feita por gravidade e no segundo, substituindo-se o frasco contendo o tampão pelo da amostra. Observou-se maior magnitude de sinal quando empregando o eletrocínético, no entanto, a resolução dos picos não foi adequada (Figura 2). Quando aplicado o modo hidrodinâmico, pode observar-se na mesma figura que os picos apresentaram uma separação mais eficiente. Apesar da maior magnitude de sinal ser mais atrativo, o modo hidrodinâmico foi mantido para todas as análises. É importante ressaltar que a coluna capilar era removida do frasco do tampão para o frasco das outras soluções, enquanto que no modo eletrocínético era necessário movimentar eletrodo e coluna.

3.2. Estudo da diferença de potencial aplicada e concentração e pH da solução eletrolítica

A qualidade da análise química depende de estudar diferença de potencial aplicada, concentração e pH da solução eletrolítica. A Figura 3 mostra o gráfico obtido quando variou-se a voltagem para solução 20,0 mmol/L de fosfato e 0,5 mmol/L CTAB com pH 9,50. O sinal de corrente fornecido pela fonte era anotado para a construção do gráfico. A linearidade da curva, $I \times V$, foi constante até 10kV, de forma que esta foi mantida para todos os estudos. Valores superiores poderiam causar aquecimento excessivo da solução (Lei de Ohm). A partir desse estudo, com o aumento da voltagem houve aumento da mobilidade eletroforética das espécies, visto que à medida que aumentou a voltagem houve diminuição dos tempos de migração das espécies e consequentemente, menor tempo de análise (Figura 4).

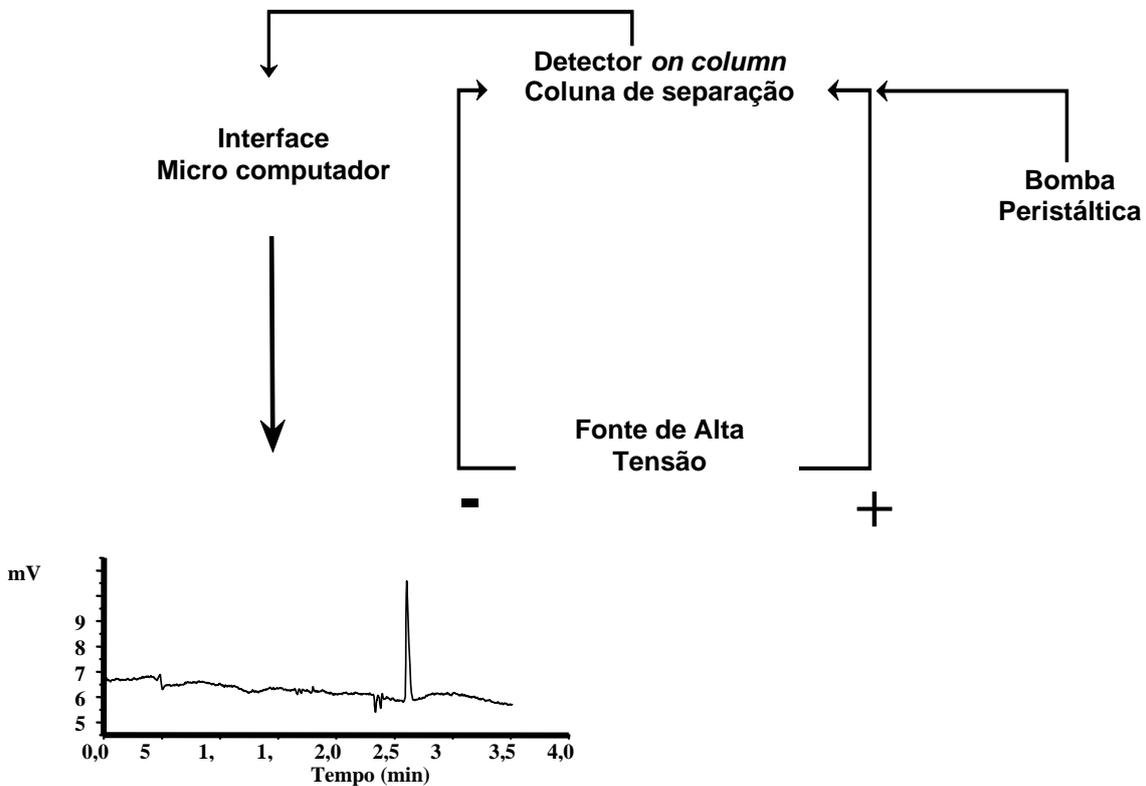


Figura 1. Diagrama esquemático do sistema eletroforético empregado para as análises.

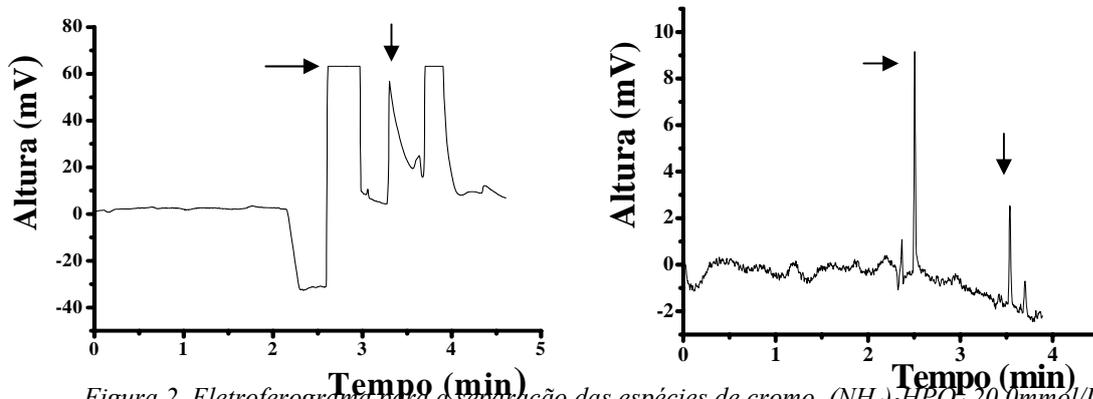


Figura 2. Eletroferograma para a separação das espécies de cromo. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 20,0mmol/L + 0,5mmol/L de CTAB em pH 9,50 e ddp 10kV. (a) modo de injeção eletrocinética 25s; (b) injeção 30s. Na figura, as setas indicam 1º pico Cr(VI) e 2º pico Cr(III)-EDTA.

O aumento da temperatura, menor viscosidade da solução, leva a um aumento do fluxo eletroosmótico ocasionado devido o efeito Joule. Assim, avaliou-se a concentração da solução eletrolítica entre 10,0 e 50,0 mmol/L para obter eficiência de separação e resolução dos picos. A partir disso, verificou-se que o menor coeficiente de variação (<5%), em relação à altura de sinal, área e tempo de migração da espécie, foi obtido empregando a solução 20,0 mmol/L pH 9,50. As soluções de concentração maior que 20,0 mmol/L apresentam um maior coeficiente de variação, além disso, altas concentrações podem comprometer a separação, pelo excesso de calor [20].

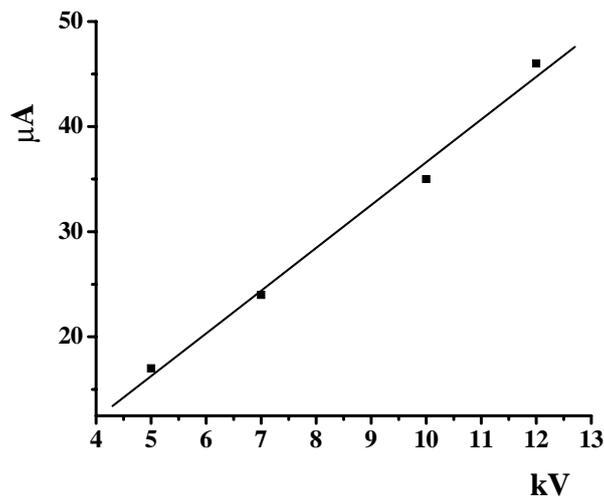


Figura 3. Gráfico $I \times V$ para solução 20 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ pH 9,50.

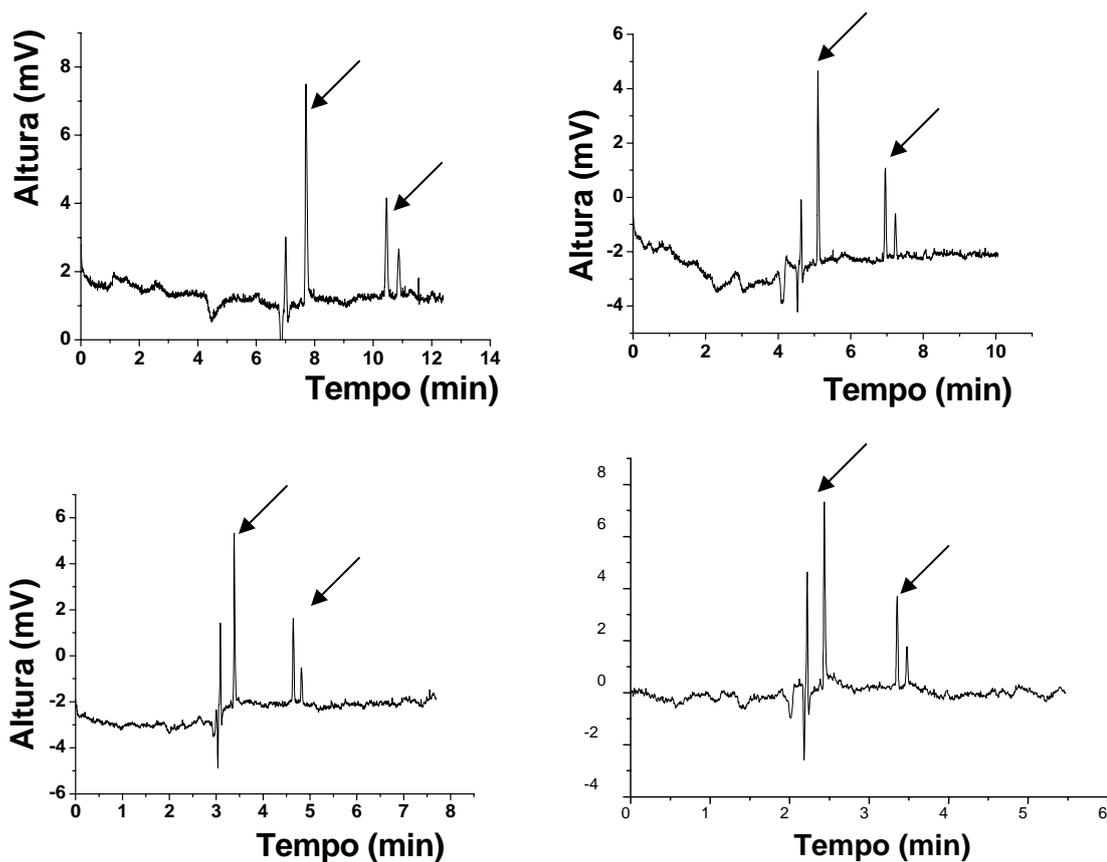


Figura 4. Eletroferogramas obtidos no estudo da variação da diferença de potencial. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 20,0mmol/L + 0,5mmol/L de CTAB pH 9,50, injeção 30s, $\lambda=190$ nm. (a) 4kV; (b) 6kV; (c) 8kV e (d) 10kV. O 1º pico refere ao Cr(VI) e o 2º pico ao Cr(III)-EDTA

A concentração da solução eletrolítica ou tampão tem grande influência na separação eletroforética. Ainda, o pH da solução tampão é um dos parâmetros que afeta fortemente a separação em CE. Este parâmetro afeta tanto o EOF quanto a mobilidade eletrolítica dos analitos [12,20].

A variação do pH da solução tampão em 8,00; 8,50; 9,00 e 9,50 mostrou que o menor coeficiente de variação, maior magnitude de sinal e perfis dos picos foram obtidos com o pH 9,50. Para solução com pH acima de 9,50, a resolução dos picos ficou comprometida para Cr(VI).

3.3. Efeito do tempo de injeção

Variando-se o tempo em 4; 5; 6; 7; 8 e 9s observou-se que à medida que o volume injetado aumentou houve aumento da magnitude do sinal analítico e aumento da dispersão eletroforética. Contudo, o tempo de injeção para o complexo Cr(III)-EDTA foi estabelecido em 30s, uma vez que para menores tempos a sensibilidade do método era comprometida. Logo, o tempo adotado na injeção da solução de Cr(VI) foi de 30s mantendo a altura do frasco em 4,5 cm.

3.4. Complexação empregando radiação microondas

Quanto à determinação de cromo, a acidificação da solução padrão e das amostras também melhorou a precisão das medidas para o complexo Cr(III)-EDTA- e também aumentou a magnitude de seu sinal analítico. A Figura 5 mostra o eletroferograma para a solução mista contendo 1,0 mg/L de Cromo(III)-EDTA- e Cr(VI).

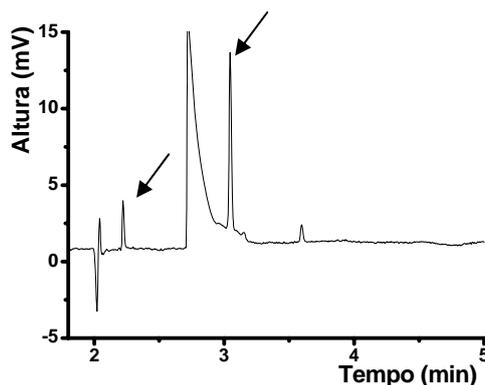


Figura 5. Eletroferograma obtido para 1,0 mg/L Cr(III) e Cr(VI). As setas indicam os picos de Cr(VI) (esquerda) e Cr(III)-EDTA (direita), respectivamente. Os outros picos não foram identificados. Aquecimento com microondas 3 min.

O uso da energia de microondas visa substituir a chapa aquecedora durante a etapa de aquecimento que é requerida para a complexação quantitativa de Cr(III) por EDTA. É sabido que a reação necessita de aquecimento para ocorrer [14]. O uso do equipamento otimizou a etapa de aquecimento e facilitou o manuseio dos béqueres contendo as soluções. O tempo de aquecimento, empregando microondas, é dependente do número de béqueres dentro da cavidade do equipamento. Assim, para facilitar o controle de tempo, as soluções permanecem na cavidade até atingir 3 minutos de fervura. Este tempo mostrou-se adequado para a total complexação do cromo, ou seja, não se observaram diferenças significativas quando comparados os sinais obtidos por CE para soluções contendo 1mg/L de Cr(III) + 1,3mg/L de EDTA e submetidas ao aquecimento empregando a chapa aquecedora e o microondas. Uma vez que a temperatura é um dos fatores que influenciam nas velocidades das reações, sendo assim a etapa de aquecimento empregando a chapa aquecedora (~100°C) ocorria em até 30 min. O uso da radiação microondas diminuiu este tempo para 3 minutos, ou seja, o tempo de aquecimento até a ebulição foi bem menor. Conclui-se que a interação da radiação com a solução é eficiente uma vez que diminui significativamente o tempo requerido para que haja formação do complexo. A partir disso, todas as soluções foram preparadas usando a radiação microondas.

3.5. Curvas Analíticas

A curva analítica construída apresentou-se linear com coeficiente de correlação 0,9775 para Cr (VI) e 0,9946 para Cr (III)-EDTA e coeficiente de variação do tempo de migração das espécies foi inferior a 5% (n=5). As Figuras 6 e 7 correspondem à curva analítica de Cr(VI) e Cr(III), respectivamente. Os limites de detecção (S/R=3) e de quantificação (S/R=10) foram 0,04 e 0,12 mg/L para Cr (III) e de 0,14 e 0,48 mg/L para Cr(VI).

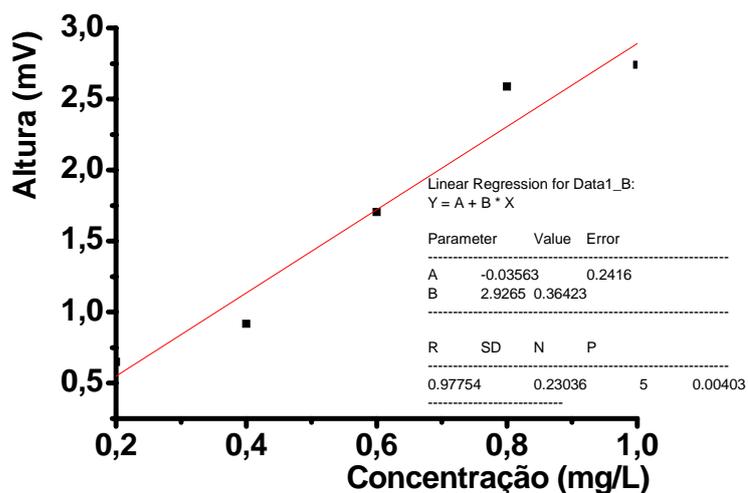


Figura 6: Curva analítica para Cromo(VI). A x C. Solução 20,0 mmol/L fosfato pH 9,50 + 0,5 mmol/L de CTAB injeção 30s, $\lambda=190$ nm e ddp 10kV.

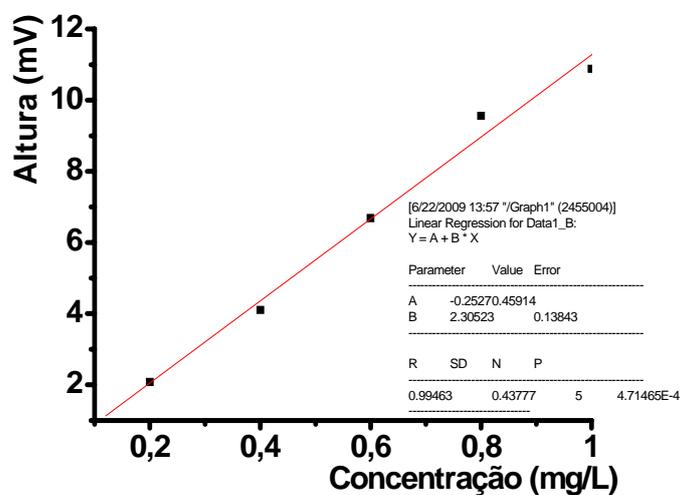


Figura 7: Curva analítica para Cromo(III)-EDTA. A x C. Solução 20,0 mmol/L fosfato pH 9,50 + 0,5 mmol/L de CTAB, injeção 30s, $\lambda=190$ nm e ddp de 10kV.

Obtiveram-se duas curvas analíticas com coeficientes lineares adequados para determinação de Fe(III), uma entre 0,5 e 10 mg/L ($r=0,9998$) e outra entre 5,0 e 40,0 mg/L ($r=0,9945$), como mostram as Figuras 8 e 9. A precisão foi melhor do que 5% ($n=5$) para tempo de migração e altura de sinal. O limite de detecção obtido foi de 0,06 mg/L.

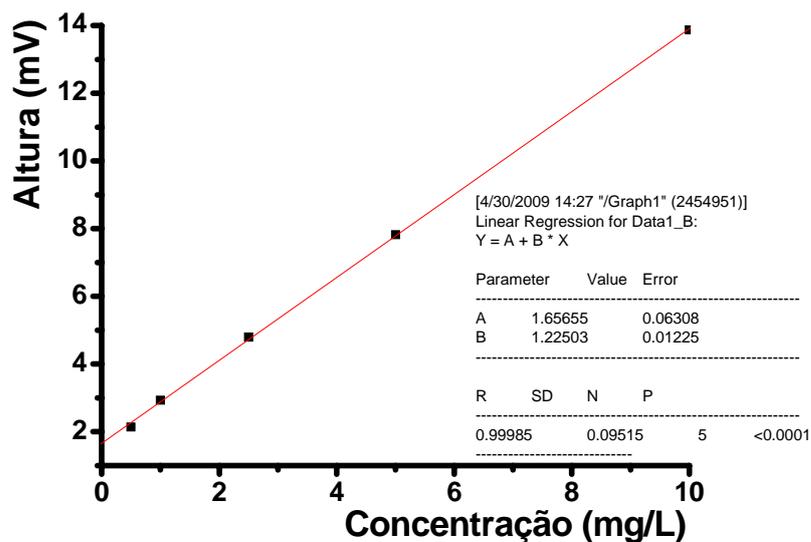


Figura 8. Curva analítica para Fe(III). A x C. Solução 25,0 mmol/L H_3BO_3 pH 9,00, injeção 30s, $\lambda=254$ nm e ddp 12kV.

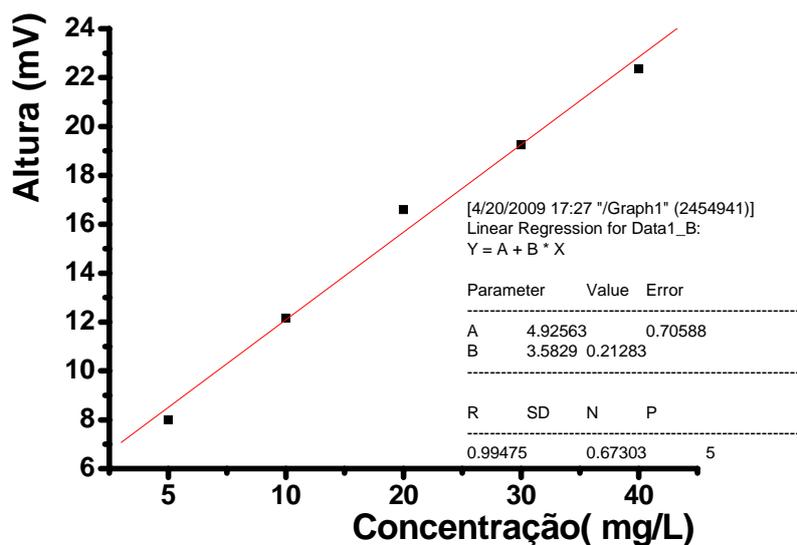


Figura 9. Curva analítica para Fe(III) A x C. Solução 25,0 mmol/L H_3BO_3 pH 9,00, injeção 30s, $\lambda=254$ nm e ddp 12kV.

3.6. Análises de Cromo em amostra real

Uma vez definidas as melhores condições para análise dos metais por CZE, o sistema foi empregado para a análise de amostras de água do açude e curtume. Inicialmente, na análise em água do açude foram mantidos os mesmos parâmetros definidos nas soluções de referências, ou seja, modo de injeção hidrodinâmico por 30 s, voltagem de separação aplicada de 10 kV (36-42 μA), concentração da solução eletrolítica fosfato de amônio dibásico de 20 mmol/L com adição de 0,5 mmol/L de CTAB, $\lambda=190$ nm e pH 9,5. A identificação de cada uma das espécies foi baseada no tempo de migração e foi verificada pela adição de Cr(VI), Cr(III) e EDTA em quantidade conhecida às amostras de água. Nenhum pico referente ao complexo de Cr(III) e

Cr(VI) foi observado no eletroferograma para a amostra de água do açude (Figura 10a). Nenhum pico referente ao complexo de Cr(III)-EDTA⁻ ou Cr(VI) foi observado para adição de 1,0 mg/L Cr(III), 1,3 mg/L EDTA ou 1,0 mg/L Cr(VI) na mesma amostra (Figura 10b). Os sinais para cromo foram detectados após a adição de 5,0 mg/L, acima disso (Figura 10c) já podem ser observados os picos referentes ao complexo de Cr(III)-EDTA.

Quanto à identificação dos picos de cromo nas amostras de Água do Curtume, em análises com uma maior concentração de EDTA, também ficou evidente que os eletroferogramas não mostraram picos referentes ao complexo Cr(III)-EDTA⁻ (Figura 11a e 11b). Comparando os eletroferogramas obtidos com e sem adição de cromo às amostras, percebe-se que não é obtido nenhum pico referente àquela espécie.

Considerando os resultados obtidos, e a influência da matriz na especiação de íons metálicos, e que há grande quantidade de matéria orgânica dissolvida na água do curtume e do açude, pode-se enfatizar que todo íon metálico adicionado é complexado pela matéria orgânica dissolvida.

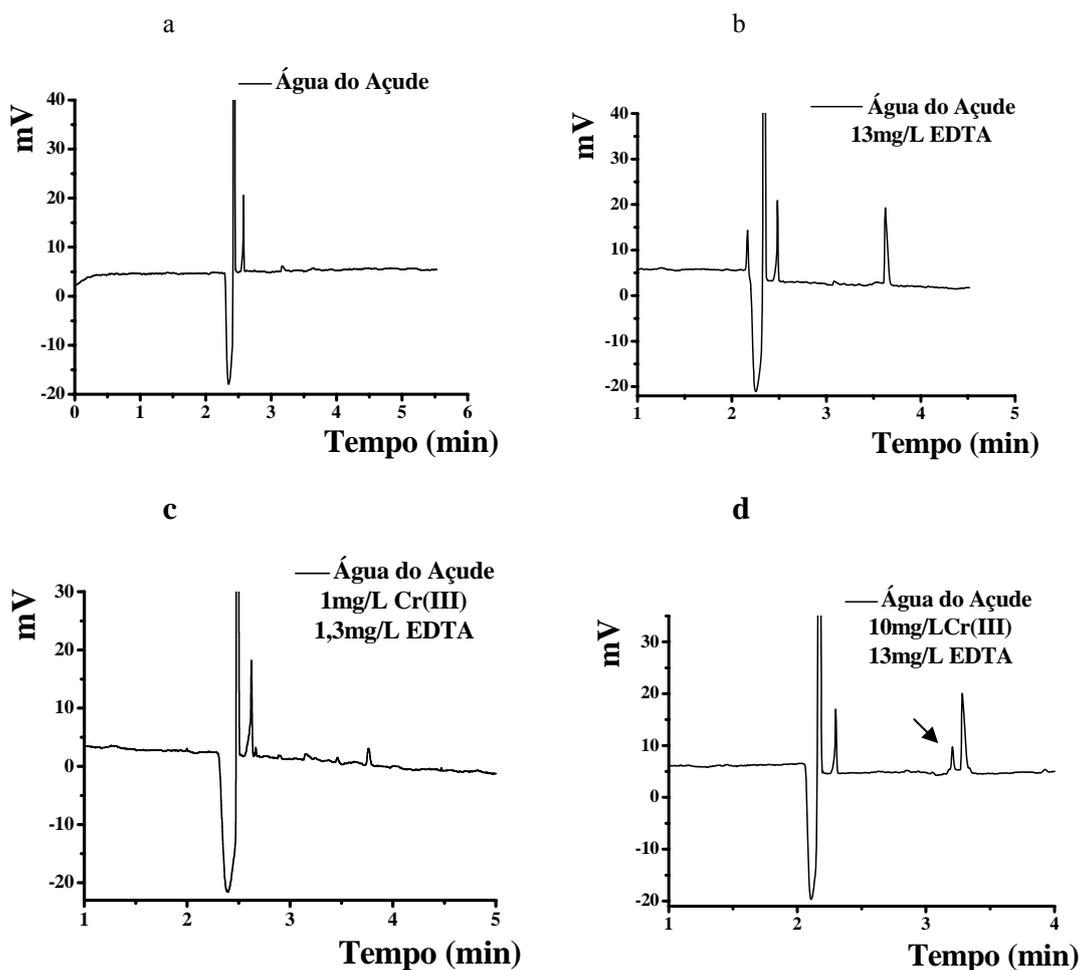


Figura 10. Análise de água do Açude. (a) Água do Açude + 1,3 mg/L EDTA. (b) da Água do Açude + 1,0 mg/L Cr(VI) + 1,0 mg/L Cr(III) + 1,3 mg/L EDTA. (c) Água do Açude + 10,0 mg/L Cr(III) + 13,0 mg/L EDTA. Os outros picos não foram identificados. Aquecimento com chapa aquecedora 30 min.

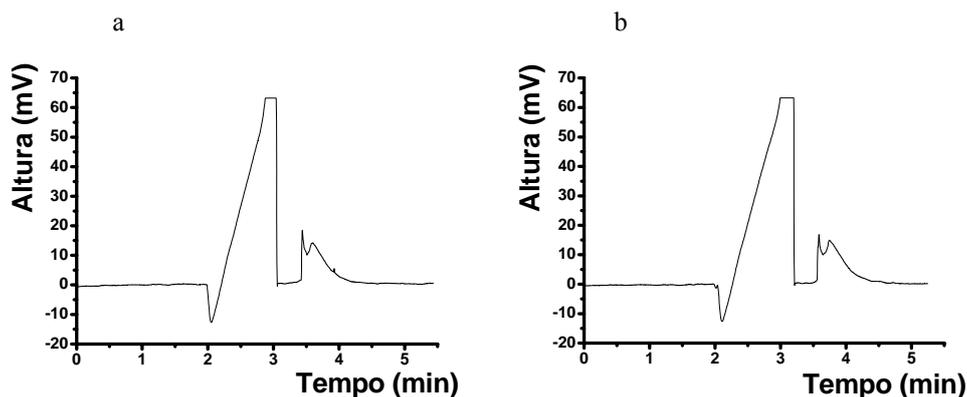


Figura 11. Análise de Água de Curtume. (a): 20 mL da Água do Curtume + 50 mg/L EDTA. (b) Eletroferograma obtido na análise de Cromo (III) e (VI) em 20 mL Água Curtume + 0,5 mg/L Cr(III) + 0,5 mg/L Cr(VI) + 50 mg/L EDTA. Outras condições como figura 5. Aquecimento com microondas 3 min.

3.7. Determinação de Fe(III) em amostras de água

As soluções de referência foram preparadas nas concentrações 0,5 a 10,0 mg/L e de 5,0 a 40,0 mg/L e analisadas a 254 nm. A Figura 12 mostra o eletroferograma para uma das soluções. A separação foi obtida em tampão 25,0 mmol/L borato pH 9,00.

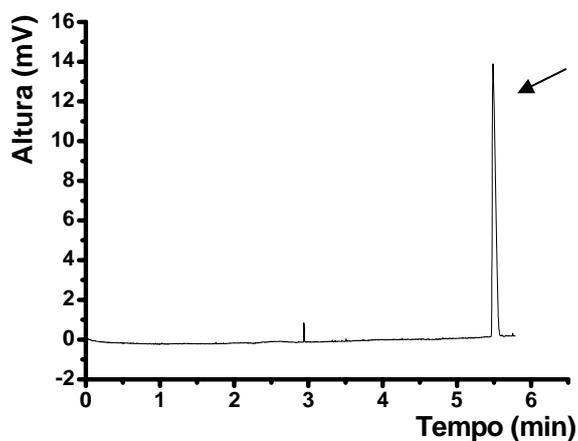


Figura 12. Eletroferograma para solução 10,0 mg/L Fe(III)-EDTA⁻. A seta indica o pico referente ao complexo.

Para melhorar a precisão das medidas, em função da altura de sinal, foi necessário acidificar as amostras. A falta de acidez suficiente causava a precipitação dos íons Fe^{+3} . Deve-se enfatizar que após isso, os resultados melhoraram significativamente e a precisão em altura de sinal foi <5%. Além disso, observou-se um aumento significativo na magnitude do sinal analítico referente ao Fe(III)-EDTA⁻. A especiação é um fator importante no que diz respeito à identificação e quantificação de alguns elementos traços em diversas matrizes, porém, observam-se inúmeras dificuldades nas separações dos compostos ligados aos metais, como por exemplo, a complexidade da matriz, contaminações com o elemento de interesse, a instabilidade das espécies, entre outras [22] Esse fato ficou evidente durante as análises das amostras reais, pois os eletroferogramas obtidos nas análises dessas amostras não mostraram picos referentes ao complexo de ferro com EDTA (Figura 13). O pico do complexo tem tempo de migração entre 5

e 6 min. Considerando isso, e que há grande quantidade de matéria orgânica dissolvida na água do curtume e do açude, pode-se enfatizar que todo Fe(III) adicionado é complexado pela matéria orgânica dissolvida. Pode observar-se na figura que não houve alteração no perfil do eletroferograma obtido após a adição do metal à amostra de água.

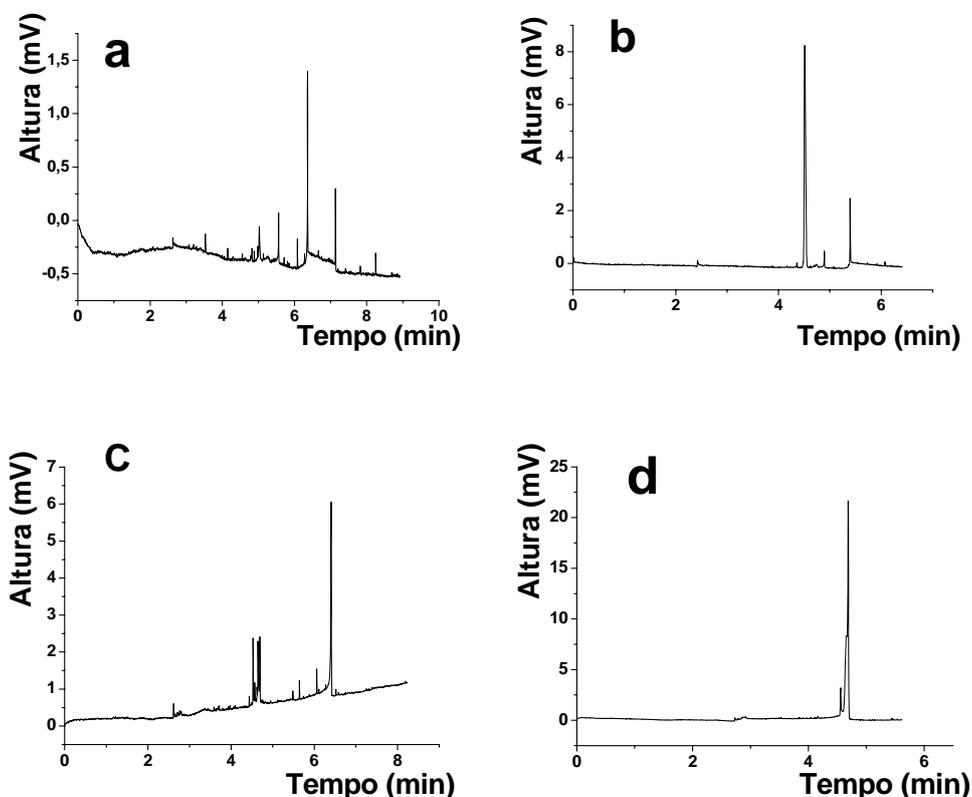


Figura 13. Eletroferogramas obtidos na análise da amostra da Água do Açude. (a) 30 mL Água + 50 mg/L EDTA. (b) 30 mL Água + 2,5 mg/L Fe(III) + 50 mg/L EDTA. (c) Água do Curtume + 50 mg/L EDTA. (d) Água Curtume + 10 mg/L Fe(III) + 50 mg/L EDTA. H_3BO_3 25 mmol/L pH 9,0 injeção 30s, $\lambda=254$ nm e ddp de 12kV.

4. CONCLUSÃO

É imprescindível ressaltar que a eletroforese capilar de zona com detecção UV mostrou-se adequada para separação de complexos Cr(III)-EDTA⁻ e Fe(III)-EDTA⁻, com tempo de análise inferior a 5 min. O uso da radiação microondas acelerou significativamente o processo de formação do complexo Cr(III)-EDTA⁻ no tempo de aproximadamente 3 min. Ao contrário da chapa aquecedora que as amostras eram colocadas para aquecer durante 30 minutos, o aparelho microondas forma um complexo com menor tempo.

O Cr(III) adicionado até 5 mg/L em água do Açude foi totalmente complexado pela matéria orgânica dissolvida, uma vez que não foi identificado pico referente ao complexo. Pode-se concluir que esses metais são complexados pela matéria orgânica dissolvida, uma vez que não foi identificado pico referente aos complexos.

Para a quantificação após a adição de 6,0 mg/L do complexo de Cr(III) adicionado em água do Açude coletada em dezembro, mediu-se a altura do sinal analítico para esta solução. A altura do sinal foi de 1,746 mV o que corresponde a uma concentração, segundo a curva analítica obtida em solução de referência, de 0,219 mg/L de Cr(III) (n=2). Uma segunda adição de 6,0 mg/L de Cr(III) foi feita a uma amostra coletada em setembro e o sinal referente à mesma concentração de Cr(III) foi de 0,360 mg/L de Cr(III) (n=3). Uma outra adição de 5,0 ou 6,0

mg/L Cr(III) ou Cr(VI) às amostras de água de açude, acondicionada em geladeira por 12 meses, mostrou que a concentração de cromo recuperada é inferior a 0,6 mg/L tanto para Cr(III) como para Cr(VI).

Os resultados obtidos e mostrados neste trabalho enfatizam a necessidade de métodos de especiação para esclarecer a disponibilidade de metais em amostras ambientais. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que tanto Fe(III) quanto Cr(III) foram totalmente complexados pela matéria orgânica dissolvida nas águas do curtume e do açude. Nenhum sinal referente aos picos dos complexos foi observado nos eletroferogramas. Outro aspecto importante é quanto ao processo de oxi-redução do cromo hexavalente, que foi reduzido ao estado trivalente e, assim, disponível para complexação com a matéria orgânica. Isso justifica o eletroferograma sem pico referente à essa espécie.

1. MOTELLIER, S.; PETIT, S.; DECAMBOX, P. Quantitative capillary electrophoretic analysis for calcium and magnesium in sodium-matrix waters. *Analytica Chimica Acta* 410: 11-23 (2000).
2. DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; LAI, E.P.C.; TIMERBAEV, A.R. Capillary electrophoresis: the state-of-the-art in metal speciation studies. *Analytica Chimica Acta* 359: 1-26 (1998).
3. FYTIANOS, K. Speciation analysis of heavy metals in natural water. *Journal of AOAC International* 84: 1763-1769 (2001).
4. WU, X-Z.; KASASHIMA, K.; SAKAI, M. Capillary electrophoresis of small anions in complex samples with a hollow fiber sampling inlet end. *Analytical Sciences* 19: 1541-1543 (2003).
5. REEDER, R.J.; SCHOONEN, A.A.; LANZIROTTI, A. Metal Speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 64: 59-113 (2006).
6. FUKUSHI, K.; ITO, H.; KIMURA, K.; YOKOTA, K.; SAITO, K.; CHAYAMA, K.; TAKEDA, S.; WAKIDA, S. Determination of ammonium in river water and sewage samples by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Chromatography A* 1106: 61-66, (2006).
7. LAAMANEN, P-I.; MATILAINEN, R. Determination of alternative and conventional chelating agents as copper (II) complexes by capillary zone electrophoresis. The first use of didecylidimethylammonium bromide as a flow reversal reagent. *Analytica Chimica Acta* 584: 136-144 (2007).
8. OWENS, G.; FERGUSON, V.K.; MCLAUGHLIN, M.J.; REID, R.J., SMITH, F.A. Determination of NTA and EDTA and speciation of their metal complexes in aqueous solution by capillary electrophoresis. *Environmental Science & Technology* 34: 885-891 (2000).
9. KARMARKAR, S.V. Anion-exchange chromatography of metal cyanide complexes with gradient separation and direct UV detection. *Journal of Chromatography A* 956: 229-235 (2002).
10. MANNIEN, P.K.G.; PANTSAR-KALLIO, M. Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations by capillary electrophoresis compared with ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* 314:67-75 (1995).
11. ORTA, D.; MUDGETT, P.D.; DING, L.; DRYBREAD, M.; SCHULTZ, J.R. SAUER, R.L. Analysis of water from the space shuttle and mir space station by ion chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 804:295-304 (1998).
12. TAVARES, M.F.M.; JAGER, A.V. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. *Química Nova* 24:363-373 (2001).
13. OKAMOTO, H.; OKAMOTO, Y.; HIROKAWA, T.; TIMERBAEV, A.R. Trace ion analysis of sea water by capillary electrophoresis: determination of strontium and lithium pre-concentrated by transient isotachopheresis. *Analyst* 128:1439-1442 (2003).
14. LIU, B-F.; LIU, L-B.; CHEN, H.; CHENG, J-K. Analysis of metal complexes by capillary electrophoresis. Effect of organic additives on separation of highly hydrophobic complexes. *Analytica Chimica Acta* 434:309-313 (2001).
15. MARQUÉS, M.J.; SALVADOR, A.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. Chromium speciation in liquid matrices: a survey of the literature. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367:601-613 (2000).
15. GINÉ, M.F.; GERVASIO, A.P.G.; LAJORANTE, A.F.; MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Interfacing flow injection with capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for Cr speciation in water samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17:736-738 (2002).
16. CARVALHO, A.R.; SCHLITTER, F.H.M.; TORNISIELO, V.L. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físicos químicos da água. *Química Nova* 3:618-622, (2000).
17. KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S., *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1993.

18. BAKER, D.R., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, 1995.
19. COSTA, A.C.S.; ASSIS, J.C.R.; FERREIRA, A.L.C.; KORN, M.G.A.; TEIXEIRA, L.S.G. Uso de irradiação de microondas na determinação espectrofotométrica de cromo com EDTA. *Química Nova* 22:194-196 (1999).
20. TAVARES, M.F.M. Mecanismo de separação em Eletroforese Capilar. *Química Nova* 20:493-518 (1997).
21. MALIK, A.K.; SEIDEL, B.S.; FAUBEL, W. Capillary electrophoretic determination of ferric dimethyldithiocarbamate as iron(III) chelate of EDTA. *Journal of Chromatography A* 857:365-368 (1999).
22. MARINS, R.V.; PARAQUETTI, H.H.M; AYRES, G.A. Alternativa Analítica para Especificação Físico-Química de Mercúrio em Águas Costeiras Tropicais. *Química Nova* 25:342-378 (2002).