

Detecção de Solutos em Cromatografia Iónica – – Detecção com Sistemas Envolvendo Reacções Pós-Coluna

J. COSTA PESSOA*

Faz-se uma revisão dos tipos de instrumentação e das técnicas que têm sido utilizados para a detecção de solutos em sistemas cromatográficos envolvendo reacções pós-coluna, dando relevo especial aos aspectos determinantes na sensibilidade da detecção. Dá-se particular atenção aos sistemas que envolvem cromatografia iónica como método de separação e à espectrofotometria como método de detecção.

INTRODUÇÃO

A detecção usando uma reacção pós-coluna (post-column reaction - PCR) envolve uma reacção química dos solutos que são eluídos da coluna, antes de estes passarem ao detector. Os principais objectivos deste procedimento são os de melhorar a especificidade e/ou sensibilidade do método de detecção, de maneira a que esta possa ser possível para concentrações menores de solutos, ou na presença de interferentes em concentrações relativamente elevadas. Em muitos casos os limites de detecção são melhorados em 1-2 ordens de grandeza ou mais.

A detecção PCR é muito utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), nomeadamente em cromatografia iónica (CI). Para a detecção dos derivados formados no reactor pós-coluna usam-se com frequência detectores condutimétricos, espectrofotométricos, fluorimétricos e electroquímicos. Os supressores que se utilizam em cromatografia iónica com detecção condutimétrica são uma forma de PCR, mas não costumam normalmente ser abordados dentro deste contexto. Este método de detecção foi discutido recentemente [1], assim como os métodos de detecção espectrofotométricos não envolvendo reacção pós-coluna [2]. A CI teve um desenvolvimento enorme desde a sua implementação e a distinção entre CI e outras áreas da cromatografia líquida, da qual a CI é um sub-tópico, é cada vez mais difícil

de se fazer. À medida que estes métodos cromatográficos de análise se desenvolvem, cada vez é dado maior ênfase a tratamentos pré-coluna e pós-coluna para facilitar a manipulação das amostras, pré-tratamento, pré-concentração e estabelecimento de métodos de detecção selectivos.

Muitos dos compostos analisados por HPLC são iões ou compostos ionizáveis. No entanto muitos dos métodos de detecção PCR são aplicáveis a estas técnicas e à CI, sendo cada vez mais difícil fazer classificações rígidas. Embora este trabalho se vá restringir principalmente às técnicas em que a separação decorre por permuta iónica e a detecção é espectrofotométrica, alguns dos artigos e técnicas que se vão mencionar envolvem processos separativos por cromatografia de pares iónicos ou por exclusão de iões, e métodos de detecção fluorimétricos ou electroquímicos.

Se os solutos (e eluente) são transparentes (ou absorvem pouco) à radiação, o detector espectrofotométrico não será sensível à sua passagem. Nalguns casos é possível obter derivados dos solutos, que já absorvem radiação, por simples reacção química destes com um reagente apropriado - reagente derivatizante - antes ou depois da separação. É mais frequente promover esta reacção de-

pois dos solutos saírem da coluna - **derivatização pós-coluna** - porque isto permite uma maior liberdade na escolha da composição da fase móvel e adição de reagentes derivatizantes. Para uma discussão comparativa dos dois métodos pode consultar-se, por exemplo, a ref. [3].

Nas técnicas de derivatização pós-coluna o reagente (ou reagentes) é "adicionado" automaticamente ao efluente da coluna cromatográfica, podendo-se considerar fundamentalmente três maneiras diferentes de o fazer [4,5]:

A. os reagentes são adicionados na forma de uma solução que é misturada directa ou indirectamente com o efluente da coluna (fig.1(A)),

B. os reagentes são adicionados através da utilização de uma fase sólida (um leito empacotado) de algum tipo (fig. 1(B)),

C. os reagentes são gerados no eluente após sair da coluna separativa. O reagente derivatizante pode ser produzido por processos electroquímicos, fotoquímicos ou térmicos [5].

Na figura 1 ilustram-se esquematicamente os métodos PCR (A) e (B), evidenciando-se que em muitos casos é necessária a existência de um dispositivo (reactor) para aumentar o intervalo de tempo que decorre entre a mistura dos reagentes e o momen-

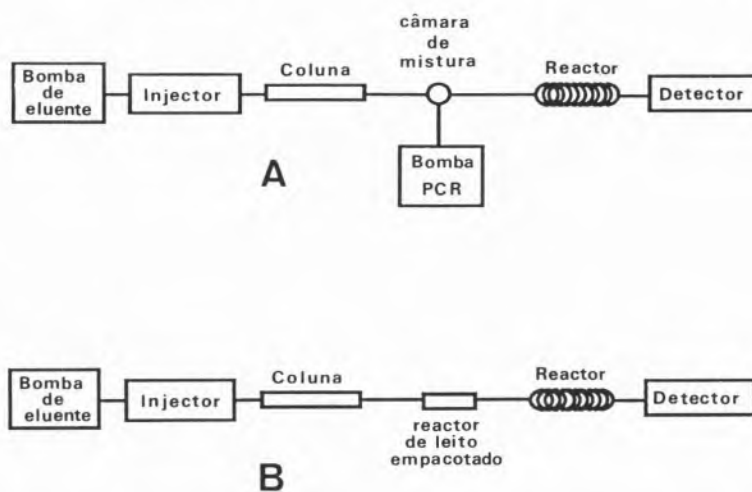


Fig. 1 - Ilustração esquemática das diversas unidades que constituem um cromatógrafo em que os reagentes são adicionados: (A) na forma de uma solução que é misturada directa ou indirectamente com o efluente da coluna; (B) através da utilização de um leito empacotado (fase sólida).

to da detecção, de forma a assegurar um tempo suficiente para a reacção se dar com um grau de conversão significativo.

A literatura existente sobre técnicas de reacção pós-coluna após separação por CI até 1985-86 foi coberta num trabalho de revisão de Dasgupta [6] que fez também uma revisão crítica dos trabalhos publicados entre 1986 e 1989 [7]. Um dos trabalhos mais importantes e completos nesta área é a monografia editada por Krull [8], que não se restringe à CI, mas envolve todos os métodos de cromatografia líquida. Brinkman [9] fez também um trabalho de revisão seleccionando alguns exemplos práticos e Haddad [10,11] fez dois artigos de revisão restringindo-se à CI. Foram ainda publicados outros artigos de revisão sobre detecção de solutos após reacção pós-coluna, nomeadamente os de Schleich e Engelhardt [12], Pickering [13], Stewart e Bachman [14] e Danielson et al [15]. Os dois últimos trabalhos cobrem uma gama muito ampla de trabalhos publicados (cerca de 300 referências no seu conjunto) e o de Danielson dedica-se com relevo especial à determinação de substâncias ionizáveis com importância biológica e farmacológica. Os trabalhos de Huber et al [16] e de Frei [17] incidem principalmente sobre os diferentes tipos de reactores utilizados e o de Woolf [18] é de carácter geral sobre os tipos e características de reactores e reacções pós-coluna.

Nos métodos que envolvem uma reacção pós-coluna, não há uma relação tão estreita entre o processo separativo e o de detecção, como acontece nos que envolvem detecção condutimétrica [1] ou espectrofotométrica directa [2a]. Aliás daqui advém uma das vantagens dos métodos PCR: não há restrições significativas ao tipo de eluentes ou colunas a utilizar no processo separativo, ou do tipo de reacções pós-coluna a promover, podendo cada uma destas operações do método de análise ser concebidas e desenvolvidas quase que de forma independente uma da outra.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS REACÇÕES PÓS-COLUNA

De entre os vários parâmetros importantes a ter em conta no desenvolvimento e operação dos métodos de detecção com reacção pós-coluna podem evidenciar-se de uma forma geral:

– a reacção deve ser rápida, se possível entre 1 e 100 ms, que é a ordem de grandeza do tempo necessário para a mistura passar ao detector.

– o sinal (por exemplo absorção de radiação) correspondente aos reagentes adicionados deve ser muito baixo; por outro lado, o produto da reacção deve ter um sinal elevado (ex. uma absorvidade molar elevada).

– a mistura do reagente e do efluente da coluna deve ser rápida e eficiente e o caudal de reagente adicionado relativamente baixo, de maneira a limitar tanto quanto possível o alargamento das bandas. Normalmente o reagente de derivatização é adicionado em excesso.

Mais concretamente, para o método ilustrado na fig.1(A), em que se adiciona uma solução ao efluente da coluna, as características desejáveis para esse reagente podem ser resumidas da seguinte forma [4,19]:

- Deve ter com os solutos uma reacção química adequada de maneira a permitir a detecção em boas condições. Normalmente o produto de reacção (ou o reagente), contém um grupo cromóforo (ou fluoróforo) bastante intenso,
- Deve ser estável de maneira a não originar variações (drift) ou ruído na linha de base,
- Deve ser miscível com o eluente e não formar precipitados na presença do eluente. O problema da solubilidade dos produtos da reacção normalmente não se põe, pois os solutos estão normalmente presentes em concentrações muito baixas,
- Deve ter uma reacção muito rápida com os solutos de maneira a que se possa evitar a utilização de enrolamento, para minimizar o alargamento das bandas,

- Deve ter características de detecção tais que, se existirem variações no grau de mistura do reagente com o eluente, não seja introduzido um nível de ruído elevado,
- Não deverá provocar corrosão nem quaisquer outras reacções com os materiais que constituem o reactor ou o detector.

ALGUNS ASPECTOS RELACIONADOS COM O EQUIPAMENTO PARA REACÇÕES PÓS-COLUNA

Como se referiu e se esquematiza na fig. 1, os sistemas PCR podem ser divididos em três tipos distintos. O primeiro (fig. 1A) envolve a utilização de uma (ou mais) bombas e respectivas tubagens para adição do reagente pós-coluna; os outros dois tipos não exigem a existência de bombas.

Bombas para reactores pós-coluna

Quando o reagente de derivatização é adicionado na forma de uma solução, tem de existir um dispositivo que forneça um caudal constante deste reagente à câmara de mistura. O ruído medido pelo detector na linha de base será então dado por [20]:

$$\text{Ruído} = [(RD)^2 + (RC)^2 + (RM)^2 + (RP)^2]^{1/2} \quad (1)$$

em que:

RD - é o ruído do detector resultante da sua parte electrónica; é o que se regista na ausência de líquido ou quando a célula está cheia de um líquido que não absorve,

RC - é o ruído associado à célula, resultante da passagem do eluente (na ausência de soluto), quando este produz um sinal diferente de zero. Este ruído é provocado normalmente por efeitos térmicos e a sua amplitude depende da ordem de grandeza do sinal produzido pelo eluente,

RM - é o ruído associado a uma mistura imperfeita entre o eluente e o reagente de derivatização,

RP - é o ruído resultante de pulsações de pressão resultantes, ou da bomba do eluente, ou da do reagente de derivatização.

Deve ter-se ainda em consideração que qualquer variação na velocidade a que o eluente ou o reagente de derivatização são introduzidos na câmara de mistura provocará ruído no detector, especialmente quando ao reagente corresponde um sinal nas condições utilizadas para o método PCR.

A título de exemplo pode considerar-se um sistema de reacção pós-coluna em que se forma, na reacção entre o soluto e o reagente adicionado, um derivado que apresenta um máximo de absorvância a 500 nm. Vai-se admitir que o reagente derivatizante absorve relativamente pouco a este comprimento de onda, mas que a mistura do reagente com o eluente, na sua passagem pelo detector, na ausência de solutos, tem um valor 0.01 unidades de absorvância (UA) superior à do eluente. Nestas condições, uma variação de 1% no caudal do reagente PCR provocará uma variação de 0.0001 UA na linha de base registada pelo detector, o que é um valor muito elevado em termos do que é necessário para uma boa detecção em HPLC [4, 19].

Cassidy et al [20] mostraram que o termo RP na eq. (1) é reponsável por cerca de 90 - 100% do ruído associado à linha de base num sistema PCR. O ruído observado depende do caudal e da contra-pressão ('back-pressure') na operação das bombas; estes efeitos estão ilustrados na fig. 2. No caso de se usarem este tipo de bombas, é fundamental existirem dispositivos adequados para amortecer as pulsações de pressão, de maneira a que a linha de base seja aceitável. Estas limitações no que respeita às pulsações de pressão da bomba PCR não são tão críticas quando as diferenças dos sinais correspondentes ao eluente e ao reagente derivatizante são muito pequenas. No entanto há sempre também a introdução de ruído por formação de bolhas de ar durante as pulsações de pressão.

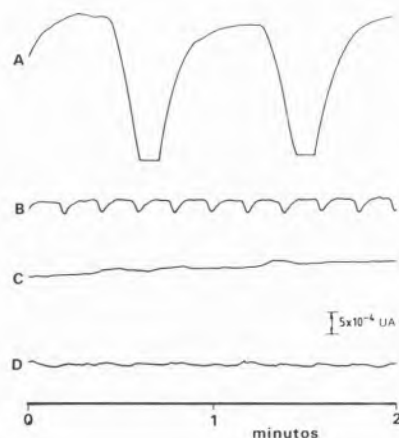


Fig. 2 - Ruído registado pelo detector, provocado por pulsações da bomba num sistema PCR [20], em que o eluente é fornecido por uma bomba de duplo êmbolo e o reagente derivatizante por um sistema pneumático (ver fig. 3).

- (A) Eluente e reagente derivatizante com caudais de 0.1 ml/min e uma contra-pressão de 689 kPa.
(B) Eluente e reagente derivatizante com caudais de 0.5 ml/min e uma contra-pressão de 4.8 MPa.
(C) Eluente e reagente derivatizante com caudais de 0.1 ml/min e uma contra-pressão de 20.7 MPa.
(D) Eluente e reagente derivatizante com caudais de 0.5 ml/min e uma contra-pressão de 20.7 MPa.

Condições experimentais: Bomba Waters M6000A para o eluente e pneumática para o reagente PCR. Eluente: ácido α -hidroxibutírico (0.28 M) a pH 3.9; reagente derivatizante: arsenazo III (120 mg/l) + HNO_3 (0.1 M) + ureia (0.01 M). Não existem colunas entre a bomba do eluente e o reactor. A contra-pressão é ajustada com uma válvula.

Por esta razão para alimentação de um caudal constante de reagente derivatizante é conveniente utilizar-se uma bomba de seringa em vez de uma bomba de êmbolo. Estas, embora sejam adequadas, requerem um enchimento frequente, o que pode implicar uma paragem do sistema cromatográfico. Alternativamente pode usar-se um sistema pneumático em que o reagente PCR é adicionado através de uma sobre-pressão (ver fig. 3). Nestes dispositivos, no reservatório do reagente regula-se uma pressão adequada de maneira a que este entre na câmara de mistura sem que ocorram os problemas de pulsações de pressão típicos das bombas de êmbolo. O inconveniente deste dispositivo é o de ser difícil regular adequadamente o caudal de reagente derivatizante.

Um outro aspecto que é muito importante neste tipo de sistemas, especialmente na detecção de iões metálicos, é a contaminação do eluente ou reagente PCR por iões metálicos resultantes da corrosão dos materiais que constituem as bombas, ou de qualquer outro componente que contacte com o eluente, ou com o reagente derivatizante. Os equipamentos construídos com materiais em que se elimina em grande parte este tipo de contaminação já entram na rotina comum da cromatografia iónica, mas não é fácil construir sistemas fiáveis completamente livres de contaminações [4]. Sob este ponto de vista, os sistemas pneumáticos do tipo representado na fig. 3, que são construídos com materiais inertes, não estando sujeitos ao mesmo tipo de problemas de fricção, apresentam mais esta vantagem em relação às bombas de êmbolo.

Câmaras de mistura

A função das câmaras de mistura é assegurar uma mistura completa do eluente com o reagente derivatizante num volume tão pequeno quanto fôr possível, de maneira a que o alargamento das bandas do soluto seja o mínimo. O sistema mais simples de mistura é o de uma junção de três vias: duas para as entradas de eluente e reagente PCR e outra para a saída da mistura. Os ângulos entre os tubos de entrada e saída podem ser variados, mas o mais vulgar é de 90° - câmara-em-T. Na fig. 4 apresentam-se câmaras de mistura deste tipo.

Quando a mistura feita pelas câmaras-em-T não é suficiente, a alternativa é inserir uma pequena coluna cheia de esferas de vidro a seguir à câmara. Este enchimento promove a mistura radial dos reagentes. Huber [16] indica critérios para a montagem destas colunas:

$$0.015 > r_m^2 / (L_m \cdot d_p) \quad (2)$$

em que L_m é o comprimento, r_m o raio da coluna e d_p o diâmetro das partículas.

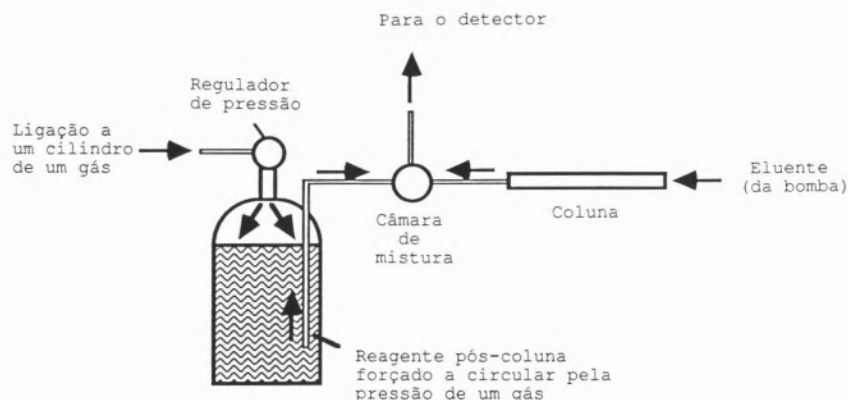
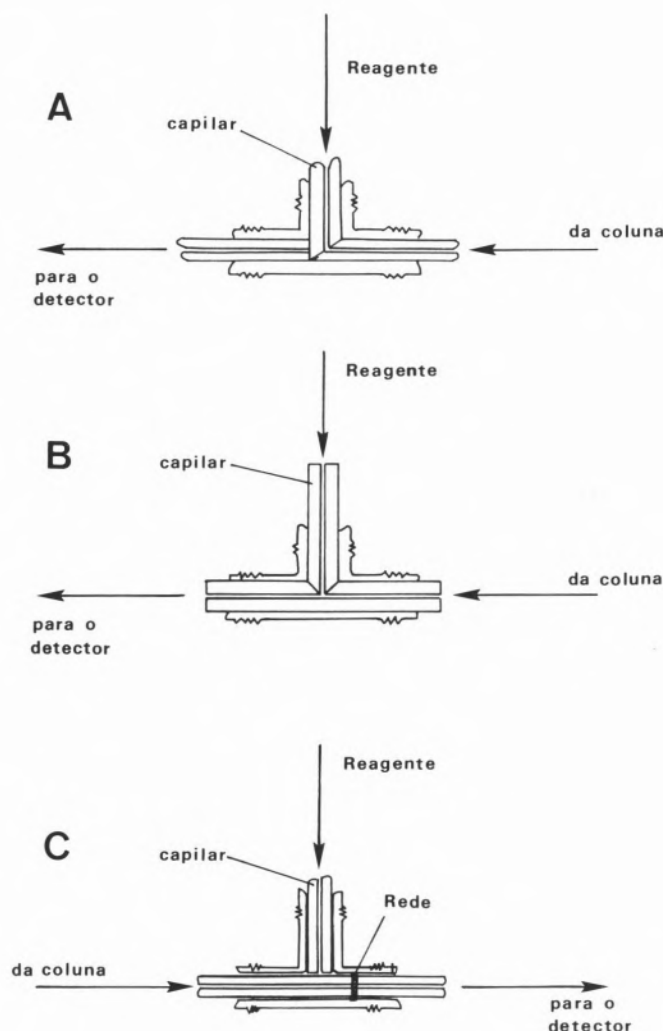


Fig. 3 - Representação esquemática de um sistema pneumático para a alimentação de um reagente pós-coluna.

Uma outra alternativa disponível comercialmente (de volume

morto muito pequeno) são os misturadores do tipo "ciclone", em que o reagente derivatizante é adicionado tangencialmente ao efluente da coluna [18].



Reactores

Vão-se mencionar primeiro os reactores do tipo da fig. 1A, introduzidos após uma câmara de mistura convencional.

Embora seja desejável que a reacção de derivatização seja muito rápida, este requisito não é limitante pois não é necessário que a reacção se dê completamente, mas sim que seja reprodutível. Nestas condições, não só os produtos de reacção não têm que ser completamente definidos, mas também não têm que ser estáveis. É no entanto importante que o tipo de reactor a utilizar seja adequado à reacção que se desenrola. Assim, de acordo com a cinética dos processos reaccionais, podem usar-se três tipos de reactores [5, 6].

1. Reactores tubulares abertos (lineares, enrolados, etc.) - para reacções rápidas, até 30 seg. (no entanto, ver reactores KOT mais adiante),

2. Reactores empacotados - para velocidades de reacção intermédias, da ordem de 0.5 - 4.0 min [5],

3. Reactores em que o fluído é segmentado - para reacções lentas (até cerca de 20 minutos). Pode fazer-se a segmentação com um líquido imiscível ou com um gás.

Existem diversos artigos de revisão que discutem os desenhos de diferentes tipos de câmaras de mistura e reacção, mas a maior parte das ques-

Fig. 4 - Tipos de câmara de mistura em T para reacção pós-coluna.

(A) Os tubos do eluente e do reagente derivatizante são cortados num ângulo de 45° e apertados um contra o outro; o tubo de saída é pressionado contra os dois tubos de entrada. O eluente e o reagente derivatizante circulam por pequenos espaços das junções e passam ao tubo de saída. O alargamento de banda é praticamente desprezável neste tipo de câmara de mistura, pois o volume vazio é da ordem de 2 µl [21].

(B) Os tubos são maquinados na junção a 60° como está indicado. Verificou-se que o alargamento de banda é o mesmo que se obtém com um tubo a "direito" com o mesmo comprimento [22].

(C) O tubo do reagente derivatizante é cortado como se indica e existe uma (ou duas) rede(s) de 120 mesh (~0,125 mm) colocada(s) entre a entrada e a saída do fluxo de eluente. O reagente derivatizante circula exteriormente à volta do tubo de entrada do eluente, passa para o interior da rede, mistura-se com o eluente e passa ao detector. Esta câmara permite uma mistura muito boa dos dois fluxos (melhor que 99.9% de uma mistura teoricamente perfeita [20]).

tões discutidas refere-se à determinação de compostos orgânicos para os quais são frequentemente necessários tempos de reacção relativamente longos. Por esta razão estes artigos focam principalmente o problema da obtenção de câmaras de reacção apropriadas minimizando-se simultaneamente o alargamento das bandas. A escolha do reactor a utilizar depende não só do tempo de reacção que é necessário, mas também do alargamento de banda que poderá ser tolerado para o reactor. Lillig e Engelhart [23] discutiram os critérios para a escolha do tipo de reactor a usar. No caso de iões inorgânicos, nomeadamente os iões metálicos, as reacções normalmente são rápidas, pelo que não é necessária a introdução de enrolamentos ou outros dispositivos a seguir à câmara de mistura.

Reactores tubulares abertos. Estes dispositivos têm de ter um volume adequado para que a reacção prossiga com o grau de conversão pretendido. Por exemplo, se o caudal total (de eluente e solução derivatizante) for de 2ml/min e se a reacção exigir 1 min. para se "completar", é necessário dispor-se de um reactor com um volume de 2ml. Se esse reactor for do tipo 1 e o tubo de 0.50 mm de diâmetro, seriam necessários cerca de 10 metros de tubo, o que introduziria um enorme alargamento das bandas.

Têm sido feitos muitos estudos sobre o alargamento de bandas em reactores pós-coluna (ex. refs. 24-27), tendo sido proposta, para tubos abertos, a equação:

$$\sigma_{ex}^2 = k d_i^2 V / 96 D \quad (3)$$

em que σ_{ex}^2 mede o alargamento (extra-coluna), k é uma constante que depende da configuração do tubo ($k = 1$ para um tubo a direito), d_i o diâmetro interno, V o volume e D o coeficiente de difusão do fluido no tubo.

Esta equação mostra como proceder para ter σ_{ex}^2 baixos: o volume do reactor (tubo) pode ser minimizado optimizando as condições de reacção, o coeficiente de difusão au-

menta utilizando solventes com viscosidade baixa ou aumentando a temperatura. A diminuição do d_i está limitada pela "contra-pressão" que é gerada.

Enrolando o tubo, cria-se uma força centrífuga que promove a diminuição do alargamento das bandas ($k < 1$). Estão inclusivamente comercializados reactores de tubo aberto formando uma "malha" (knitted open-tubular = KOT), que consistem em tubos de Teflon formando uma malha tridimensional [28-31], em que os fluxos secundários gerados promovem uma diminuição apreciável do termo σ_{ex}^2 . O alargamento das bandas é aceitável para reacções até cerca de 5 min.

Reactores de leito empacotado. Estes contêm normalmente enchimentos de partículas de vidro não poroso de diâmetro muito pequeno e podem ser considerados como colunas de HPLC que não retêm os solutos. A sua função é principalmente dar tempo para que a reacção se dê sem que ocorra um alargamento significativo das bandas, o que seria inevitável nos reactores tubulares abertos de volume e tempo de permanência equivalentes. Normalmente usam-se tubos com 2-4 mm de diâmetro interno com partículas de 15-30 μ m. Para tempos de reacção entre 1 e 5 min. estes reactores ou os KOT podem ser adequados [23].

Reactores de fluxo segmentado. São os de implementação mais complexa, pelo que são os utilizados menos frequentemente. No entanto, nas reacções que necessitam de vários minutos, pode não haver alternativa. Se não ocorrer passagem de soluto de um segmento para o outro e se os segmentos tiverem dimensões suficientemente pequenas, o alargamento das bandas é efectivamente evitado. Para uma discussão dos aspectos relacionados com a segmentação e des-segmentação do fluxo podem consultar-se as refs. 32 a 34.

Reactor de fase sólida. É um tipo de reactor empacotado que não se deve confundir com os que se destinam apenas a reter o fluido durante um intervalo de tempo suficiente

para se dar a reacção de derivatização. Nestes reactores o reagente de derivatização está imobilizado sobre um suporte sólido, como é o esquematizado na fig.1(B). O reagente pode estar ligado ao suporte por forças de adsorção física ou por ligações iónicas ou covalentes.

Quando utilizados para a adição de reagente derivatizante, os reactores de leito empacotado têm algumas vantagens quando comparados com os reactores em que o reagente é adicionado na forma de uma solução, pois não é necessária a utilização de bomba e o volume do fluido não aumenta, pelo que o alargamento das bandas é normalmente menor. Além disso não há reagente de derivatização no eluente, pois a reacção tem características heterogêneas, dando-se entre os solutos e o reagente imobilizado na fase sólida. A existência de reagente de derivatização no eluente implica normalmente um aumento do ruído. Em muitos casos não são necessários enrolamentos para que a reacção prossiga com um grau de conversão satisfatório (ver fig. 1B).

Os requisitos a que um reactor de leito empacotado para adição de reagente derivatizante deve obedecer podem ser resumidos da seguinte forma [4, 35]:

- o reagente imobilizado deverá ser estável no eluente utilizado,
- o suporte sólido deverá ser estável mecanicamente nas condições de pressão a que o reactor funciona,
- o reactor não deverá contribuir excessivamente para o alargamento da banda,
- a capacidade do reactor deve ser tal que este possa ser usado durante bastante tempo antes de esgotar o reagente,
- Os produtos de reacção não deverão ser retidos de forma irreversível no empacotamento do reactor, nem deverão ser produzidos gases ou precipitados em reacções com o eluente ou solutos.

Como exemplo deste tipo de reactores de leito empacotado podem citar-se as colunas supressoras utilizadas na CI com detecção conduti-

métrica [1] e as colunas de substituição (ver mais adiante).

Os reactores de enzimas imobilizados são um dos tipos de reactores de fase sólida mais usados. Uma das vantagens deste tipo de reactores é a sua especificidade; como apenas um soluto (ou um grupo restrito de solutos) reage, a reacção pós-coluna é selectiva o que pode ser importante para obter melhores condições de detecção.

Existem outros tipos de leitos empacotados e muitas aplicações já desenvolvidas (ver por ex. a ref 18). Como a utilização deste tipo de reactores é relativamente recente, é natural que venham a surgir muitas outras aplicações.

Reactores fotoquímicos. Estes consistem numa fonte de radiação, normalmente uma lâmpada de mercúrio ou xénon, envolvida por um tubo de Teflon. De início eram utilizados enrolamentos, mas a introdução dos reactores KOT veio permitir perdas de eficiência do sistema cromatográfico muito menores. Solutos que são susceptíveis de sofrerem reacções fotoquímicas de que resultam produtos com maior absorvidade, fluorescência ou actividade electroquímica, podem ser detectados com boa sensibilidade e/ou selectividade.

As principais vantagens deste tipo de reactores fotoquímicos são: (i) não se dá alargamento das bandas ou este é mínimo, (ii) não há quase restrições à composição da fase móvel e (iii) não é necessária a utilização de qualquer reagente derivatizante.

Reactor de membrana - O reagente derivatizante pode ser adicionado ao eluente através de uma membrana semi-permeável adequada, por exemplo na forma de um tubo (ou fibra) oco. O primeiro reactor deste tipo foi introduzido pela Dionex e era constituído por um tubo de uma membrana de um material poroso que é mergulhado numa solução contendo o reagente de derivatização. O reagente atravessa a parede do tubo, mistura-se com o efluente da coluna que circula no seu interior e reage com os iões do soluto.

Neste tipo de dispositivos a concentração do reagente PCR deverá ser suficientemente grande de maneira a assegurar a passagem rápida de reagente para o interior do tubo e a permitir a obtenção de curvas de calibração lineares. Em muitos casos a solução contém um tampão de pH com uma concentração relativamente elevada de maneira a assegurar que as reacções sejam reproduzíveis, rápidas e completas. Utilizando-se soluções com concentrações elevadas, há o risco de precipitação de reagentes e os tubos, válvulas e célula do detector podem acumular depósitos ou mesmo entupir. As soluções devem ser todas previamente filtradas e pode haver a necessidade de limpar o sistema diariamente [36].

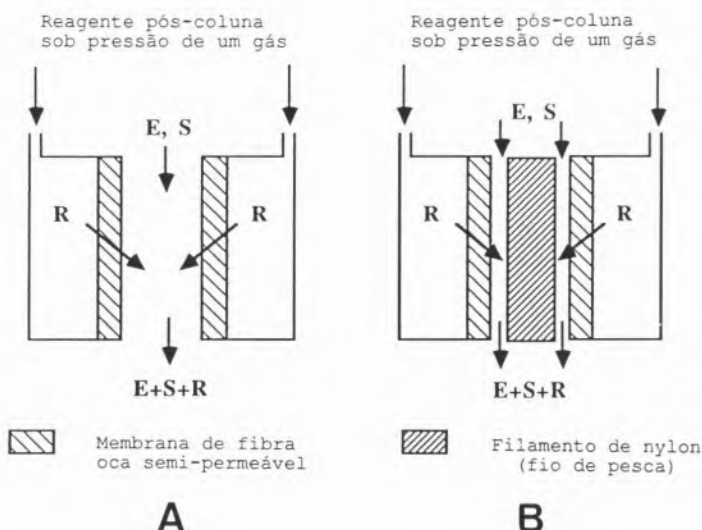
Verificou-se posteriormente que membranas não porosas de uma resina de permuta iónica podem também ser utilizadas para a introdução de uma grande variedade de moléculas de pequenas dimensões sem haver a necessidade de bombagem mecânica ou pneumática, como é feita para as câmaras-em-T, e frequentemente sem ocorrer diluição do efluente da coluna [6]. Neste tipo de reactor o fluxo de eluente circula no interior de uma fibra oca, enquanto que o reagente derivatizante circula à volta do exterior dessa fibra. O reagente difunde-se através das paredes da fibra e mistura-se

com o eluente. Tenta-se diminuir a mistura na direcção longitudinal, que provoca um alargamento das bandas do soluto, enrolando a fibra, o que por outro lado promove uma melhor mistura na direcção radial.

Na fig. 5(A) apresenta-se esquematicamente como funciona este tipo de reactor, que tem muitas semelhanças com o reactor de fibra-oca referido na parte I [1], que actua como supressor na detecção condutimétrica em cromatografia iónica. O reactor de membrana constituído por permutador de iões foi introduzido inicialmente para a determinação de solutos orgânicos [37]. Actualmente é muito utilizado na determinação de solutos inorgânicos, estando disponíveis no mercado equipamentos deste tipo.

Cassidy et al [20] mostraram que a mistura do eluente nos reactores de membrana em forma de anel (fig. 5(B)) é praticamente perfeita, pelo que o termo RM da eq. (1) é desprezável em relação ao RP. Por outro lado o alargamento de banda é

Fig. 5 - Ilustração esquemática do funcionamento: (A) de um reactor de membrana de fibra oca, (B) um reactor de membrana em forma de anel, para reacções de derivatização. E representa o eluente, S o soluto e R o reagente derivatizante. Os reactores do tipo (B) podem ser construídos tomando uma fibra oca do tipo de (A) e introduzindo no seu interior um filamento de nylon (ex. um fio de pesca). Para uma descrição mais pormenorizada dos factores a ter em atenção neste tipo de reactores podem consultar-se as refs. 20 e 37.



muito menor do que nos reactores de fibra oca do tipo dos da fig. 5(A). Do ponto de vista operacional, nos reactores de membrana em forma de anel (fig. 5(B)), a perda de pressão no percurso do eluente é muito maior, pelo que há o risco de este atravessar a membrana e penetrar na zona percorrida pelo reagente PCR, especialmente para caudais de eluente relativamente elevados.

Genérica e resumidamente pode dizer-se que os reactores de membrana para a introdução de reagente pós-coluna, além de serem dispositivos relativamente simples, têm como vantagens [38]: (i) não ser necessária uma bombagem mecânica (ou pneumática com pressões relativamente elevadas), (ii) não se dar diluição da amostra, minimizando-se assim o

alargamento das bandas, (iii) os níveis de ruído são muito menores do que com as câmaras-em-T, (iv) a reprodutibilidade é muito boa.

DETECÇÃO DE ANIÕES INORGÂNICOS

Como já se referiu, as reacções químicas que são utilizadas na detecção de espécies inorgânicas são normalmente muito rápidas e na pior das hipóteses será apenas necessário colocar um tubo enrolado, relativamente curto, entre a câmara da mistura e o detector. Há muitos exemplos de determinação de aniões envolvendo métodos PCR e na tabela 1 resumem-se alguns dos publicados. Existem outros exemplos referidos nos artigos de revisão já citados.

Um dos reagentes derivatizantes mais versáteis na determinação de aniões é o $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ que é praticamente incolor devido ao facto de o ião perclorato ser um agente complexante muito fraco. No entanto, em meio ácido o $\text{Fe}(\text{III})$ forma complexos corados com muitos aniões com máximos de absorção na gama 300-350 nm [42, 43, 56, 57]. Os eluentes não devem conter aniões que possam formar complexos com o $\text{Fe}(\text{III})$. Por esta razão são normalmente utilizados sais de nitrato e perclorato.

A técnica é aplicável à análise de aniões polivalentes como os polifosfatos e polifosfonatos. Este tipo de compostos têm uma afinidade muito elevada pelos permutadores de aniões e são difíceis de separar por CI. No

Tabela 1 - Alguns exemplos de detecção de aniões inorgânicos com reacção pós-coluna com detector espectrofotométrico (e de fluorescência) (adaptado da ref. 3, pág. 399)

Solutos	Reagente pós-coluna	Produtos de reacção	Modo de detecção	Ref.
Ácidos poliaminocarboxílicos, polifosfatos	Azul de Ca-metiltimol	Complexos incolores	Esp (605 nm)	39
Ácidos poliaminocarboxílicos, polifosfatos, etc.	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	Complexos de $\text{Fe}(\text{III})$	Esp (330 nm)	40
CN^- , SCN^-	Cloramina-T Piridina-ácido barbitúrico	Produto da reacção de König	Fluor (607 nm)	41
EDTA, NTA, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , citrato, $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$	$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$	Complexos de $\text{Fe}(\text{III})$	Esp. (340 nm)	42 43
HPO_4^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $\text{P}_4\text{O}_{13}^{6-}$	Mo (V) – Mo(VI)	Heteropolimolibdatos (azuis)	Esp (830 nm)	44
$\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, HPO_3^{2-} , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$	Mo (V) – Mo (VI)	Heteropolimolibdatos (azuis)	Esp (830 nm)	45
I^- , Br^-	Cloramina-T + DMAPM	Reacção catalítica	Esp (600 nm)	46 47
Aniões inorgânicos	$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$	Complexos de $\text{Fe}(\text{III})$	Esp. (340 nm)	48
NO_2^- , NO_3^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, I^-	Ce (IV) em H_2SO_4	Ce (III)	Fluor (350 nm)	49
Ácidos fosfónicos	Al-Morin	Complexos de Al (III)	Fluor (480 nm)	50
Ácidos fosfónicos	$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$	Complexos de $\text{Fe}(\text{III})$	Esp (300 nm)	51
Polifosfatos, fosfonatos	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} + \text{NH}_4\text{VO}_3$	Fosfovanadomolibdatos	Esp (410 nm)	52
S^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-}	$\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$	Complexos de $\text{Fe}(\text{III})$	Esp (335 nm)	53
$\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_5\text{O}_6^{2-}$				
SiO_3^{2-}	Na_2MoO_4	Molibdenosilicato	Esp (410 nm)	54
SO_4^{2-}	Cloroanilato de Ba	BaSO_4	Esp (530 nm)	55

DMAPM = 4,4' -bis (dimetilamino) difenilmetano
Esp = espectrofotométrico, Fluor = fluorescência

entanto, com colunas de capacidade baixa e usando ácido nítrico como eluente, conseguem-se separações de muitos polianiões, mas devido às concentrações elevadas de ácido nítrico que são utilizadas não é possível a detecção condutimétrica. Usando como reagente pós-coluna o $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ ou o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, podem ser determinados com detector espectrofotométrico não só os polisfosfatos como alguns ácidos poliaminocarboxílicos como o ácido nitrilotriacético (NTA) e o EDTA.

Na fig. 6 apresenta-se um cromatograma com a separação de polisfosfonatos Dequest, polisfosfatos e ácidos poliaminocarboxílicos, que constitui um exemplo com importância na análise de detergentes.

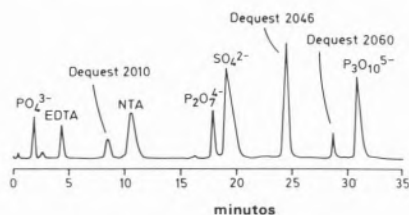


Fig. 6 - Exemplo de separação de polisfosfonatos Dequest, polisfosfatos e agentes complexantes numa coluna de capacidade baixa, eluição com gradiente de ácido nítrico e reacção pós-coluna com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ com detecção espectrofotométrica a 340 nm [4]. Um dos aspectos importantes neste tipo de separações é que, envolvendo solutos que são agentes complexantes, é essencial que os diversos componentes que contactam com o eluente sejam construídos com materiais inertes. O eluente deve também ser preparado a partir de ácido nítrico super-puro.

DETECÇÃO DE CATIÕES INORGÂNICOS

Os métodos de cromatografia iónica com detecção PCR foram desenvolvidos a um nível que estes podem ser considerados entre os melhores para a análise de muitos catiões [4, 58, 59]. Na maioria dos casos promove-se a reacção dos catiões com um reagente que forma complexos corados e utiliza-se detecção espectrofotométrica.

Um aspecto importante na separação de catiões multivalentes advém do facto de, como têm grande

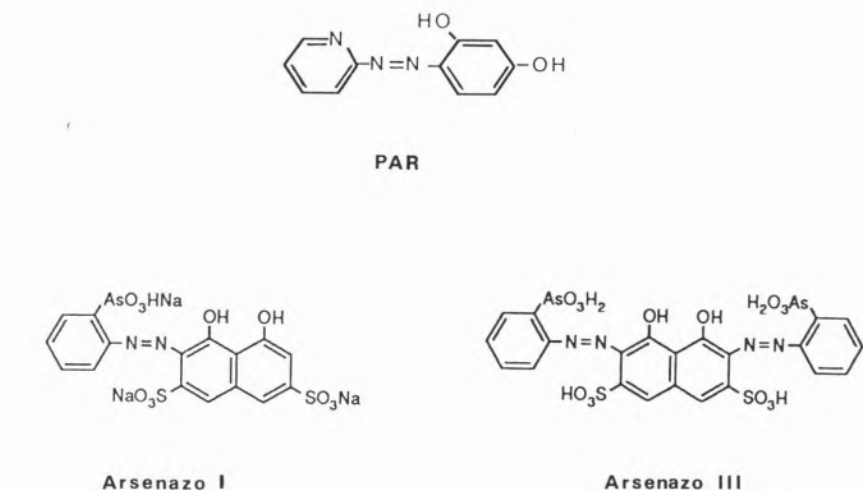


Fig. 7 - Estruturas de alguns dos reagentes que são utilizados vulgarmente nos métodos que envolvem reacção pós-coluna e detecção espectrofotométrica na análise de iões metálicos.

PAR: 4-(2-piridilazo-resorcinol),
Arsenazo I: ácido 2-(2-arsonofenilazo)-1,8-dihidroxinaftaleno-3,6-disulfónico,
Arsenazo III: ácido 2,7-bis (2-arsonofenilazo)-1,8-dihidroxinaftaleno-3,6-disulfónico.

afinidade pelas resinas de permuta cationica sulfonadas, têm de ser eluídos com eluentes que contêm agentes complexantes (ex. oxalato, tartarato, citrato, etc.). Nestas condições, o reagente derivatizante deve ser tal que desloque facilmente estes ligandos, o que limita bastante a gama de compostos que é possível usar.

Além disso, deverá definir-se previamente se interessa utilizar um método de características universais

ou selectivas. Na verdade, reagentes que formam complexos corados com uma gama muito variada de iões metálicos, são úteis para um método de

Tabela 2 - Iões que formam complexos corados com o Arsenazo I, Arsenazo III e PAR^a e que podem ser analisados com métodos de cromatografia iónica envolvendo reacção pós-coluna com detecção espectrofotométrica^b (adaptado da ref.^a 4, pág. 400 e ref.^a 36, pág. 30).

Ião metálico	Reagente PCR			Ião metálico	Reagente PCR		
	Arsenazo I	Arsenazo III	PAR		Arsenazo I	Arsenazo III	PAR
Al (III)		XX		Th (IV)		XX	XX
Bi (II)			XX	U (VI)		XX	XX
Cd (II)			XX	V (IV)			XX
Ca (II)	XX	XX	X	Zn (II)		XX	XX
Mg (II)	XX	XX	X	Hf (IV)		XX	XX
Cr (III)		XX		Zr (IV)		XX	XX
Co (II)			XX	Hg (II)			XX
Fe (II)			XX	Ni (II)			XX
Fe (III)			XX	Sr (II)		XX	
Pb (II)		XX	XX	Lantanídeos	XX	XX	XX
Mn (II)			XX				

^a Ver figura 7

^b XX – forma-se um complexo corado sendo os limites de detecção razoavelmente baixos

X – forma-se um complexo corado mas os limites de detecção não são bons.

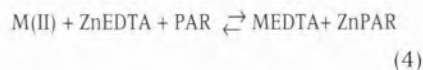
detecção universal, enquanto que reagentes que apenas formam complexos com um número restrito de iões metálicos podem ser aplicados em métodos de detecção selectivos. Os reagentes que são utilizados com mais frequência para a detecção de iões metálicos são o PAR e o Arsenazo III. Na tabela 2 indicam-se alguns dos catiões que reagem com estes compostos produzindo complexos corados. De uma maneira geral o PAR é o reagente mais utilizado na detecção dos iões metálicos de transição e o Arsenazo III na análise dos iões lantanídeos [4].

Metais alcalinos e alcalino-terrosos

Dada a variedade de bons métodos alternativos para a análise destes catiões, incluindo a CI com detecção condutimétrica [1] e a sua fraca tendência para a formação de complexos, têm sido desenvolvidos relativamente poucos métodos de CI com detecção PCR.

Num método proposto por Nagashima [60] para a análise de Mg(II) e Ca(II) em fluidos biológicos, utiliza-se como eluente uma mistura de etilenodiamina (2 mM) e ácido tartárico (4 mM), promovendo-se a reacção pós-coluna com Arsenazo I [150 g/ml em tampão de amónia (20 mM) a pH 10] sendo a detecção a 570nm. Os limites de detecção indicados são 0.03 ppm o que é bastante bom, tanto mais que com este tipo de amostras a detecção espectrofotométrica sofre menos interferências que a condutimétrica [33].

Os metais alcalino-terroso não formam complexos corados adequados com o PAR, mas a sensibilidade do método pode aumentar se se usar como reagente pós-coluna uma solução equimolar de PAR e do complexo Zn(II) com EDTA. O complexo ZnEDTA não é tão estável como o que se forma com muitos outros iões metálicos, mas é muito mais estável do que o complexo ZnPAR. Assim, o complexo ZnPAR não se forma em quantidade significativa numa mistura equimolar de PAR com Zn(II) e EDTA. Quando um ião metálico sai da coluna, nomeadamente um alcalino-terroso, na câmara de mistura dá-se a reacção:



A espécie ZnPAR é fortemente corada e a detecção baseia-se na absorção deste complexo a 490 nm.

Com iões metálicos que não reagem da forma adequada com PAR, mas formam complexos estáveis com EDTA, podem obter-se melhores limites de detecção do que na reacção unicamente com PAR [61-67]. Por exemplo, Yan e Schwedt [67] obtiveram boas separações de Fe(II), Cu, Zn, Co, Fe (III) e Mn em 2.5 minutos com uma coluna de permuta catiónica e de 11 metais (incluindo alcalino-terrosos) com um eluente de tartrato (0.1 M) a pH 3.05 em 24 minutos, com limites de detecção da ordem de 1 a 2 ppb sem pré-concentração e níveis inferiores a 1 ppt em água desionizada com pré-concentração. Com o Fe (III), Pb, Cd e Fe(II) os autores [67] obtiveram melhor sensibilidade na reacção com a solução de PAR-Zn-EDTA do que na reacção directa com PAR.

Num outro trabalho Schwedt e colaboradores [64] aplicaram este método na análise de Ca(II) e Mg(II) em vinhos e sumos, usando como eluente uma mistura de etilenodiamina (2 mM) e ácido oxálico (1.5 mM) a pH 4.0. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com a espectroscopia de absorção atómica, mas a CI tem a vantagem de permitir a determinação simultânea dos iões e de ter menos interferências da matriz [64].

Fritz e colaboradores [36, 64] desenvolveram também um sistema para a análise muito rápida de Mg(II) e Ca(II) (30 segundos) em que a detecção envolve a reacção pós-coluna com Arsenazo I.

Detecção de metais de transição utilizando PAR como reagente pós-coluna

Observando a tabela 2 verifica-se que o PAR forma complexos corados com um grande número de iões metálicos de transição. Além disso a reacção é muito rápida, não sendo normalmente necessário introduzir em enrolamento entre a câmara de mistura e o detector para dar tempo a que se complete. Normalmente usa-se uma solução diluída de PAR num tampão básico [ex. 2 mM de PAR em amónia (3M) e acetato de amónio (1M)] e faz-se a detecção na gama 500-540 nm. Convém manter a solução de PAR em atmosfera inerte pois este reagente oxida-se com facilidade. Na tabela 3 dá-se uma ordem de grandeza dos limites de detecção que se podem obter. Verifica-se que a sensibilidade é boa para os iões metálicos de transição e lantanídeos e que é má para o Ca(II) e Mg(II) [69]. Estes limites de detecção dependem obviamente das condições de reacção, nomeadamente da concentração do PAR, dado que esta influencia directamente o ruído da linha de base. Convém usar uma concentração de PAR tão baixa quanto possível, desde que isso seja compatível com a concentração de iões metálicos na amostra.

Tabela 3 - Ordem de grandeza dos limites de detecção obtidos para alguns iões metálicos na CI com reacção pós-coluna com PAR [69]^a.

Ião metálico	Limite de detecção ^{b, c} (ng)	Ião metálico	Limite de detecção ^{b, c} (ng)
Bi (III)	5	Co (II)	0.5
Cd (II)	25	Mn (II)	5
Ca (II)	2500	Ni (II)	1
Mg (II)	8300	Pb (II)	5
Cu (II)	1	Zn (II)	3
Fe (II)	25	Lantanídeos	1-5

a - Solução contendo: PAR (0.2 mM), amónia (2M) e acetato de amónio (1M); detecção a 540 nm.

b - Limite de detecção considerado como sendo 2 vezes o nível do ruído (ver por exemplo a ref. 1).

c - Se se fizer uma pré-concentração da amostra os limites de detecção diminuem consideravelmente.

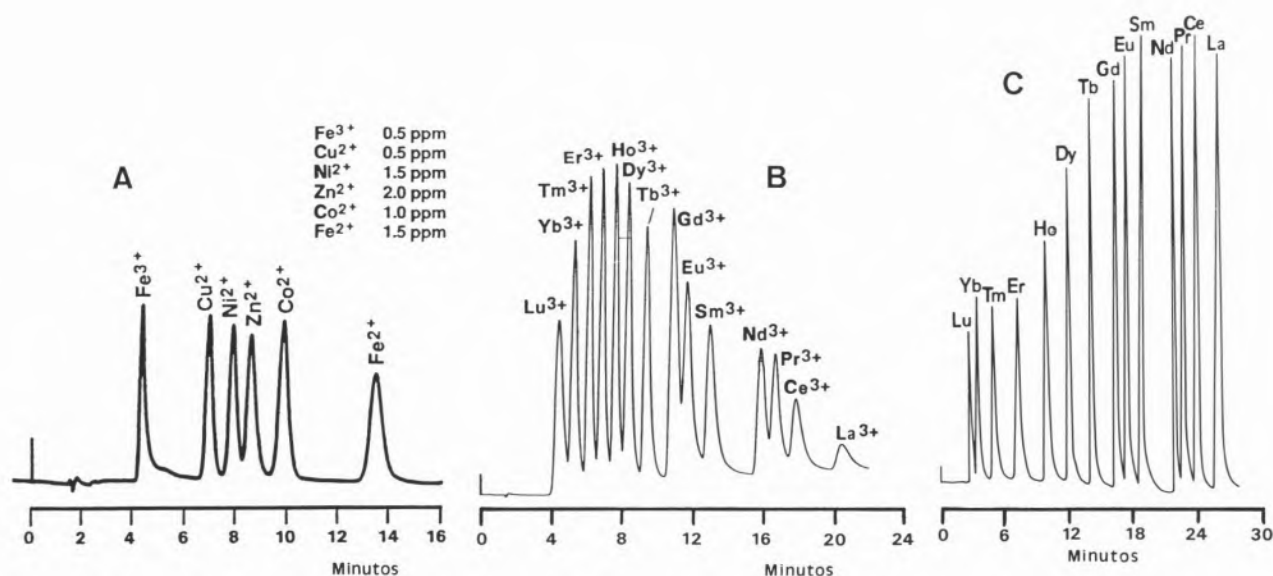


Fig. 8 - Exemplo de separação de cátions seguida de reacção pós-coluna com um reactor de membrana: (A) separação de iões metálicos de transição numa coluna catiónica Dionex HPIC-CS5, reactor de membrana sem enrolamento, usando PAR como reagente de derivatização. Os limites de detecção nesta técnica são da ordem de 20-40 ppb [70]. (B) separação de iões lantanídeos numa coluna de permuta catiónica Dionex HPIC-CS3, reactor de membrana seguido de um enrolamento usando PAR como reagente de derivatização [70]. Injeção de 50 μ l de uma solução contendo 10 ppm de cada ião. (C) separação de lantanídeos numa coluna de permuta catiónica (Nucleosil SA) com um eluente contendo ác. 2-metil-láctico a pH 4,6, seguida de reacção pós-coluna com Arsenazo I [71]. Injeção de 20 μ l de uma solução contendo 10 ppm de cada cátion.

Na fig. 8A apresenta-se um exemplo de um cromatograma em exemplo de reacção pós-coluna com PAR e detecção espectrofotométrica. Trata-se de uma separação de complexos aniônicos de PDCA (PDCA = ácido piridino-2,6-dicarboxílico), o qual é introduzido no eluente, com uma coluna que tem capacidade para separar cátions e aniões. Com outro agente complexante mais fraco no eluente (ex. oxalato) as separações já poderiam dar-se em modo misto, isto é envolverem complexos catiónicos e aniônicos, simultaneamente.

Na fig. 8B apresenta-se um outro exemplo de detecção espectrofotométrica após reacção pós-coluna com o PAR. Trata-se de uma separa-

ção de lantanídeos em que a selectividade é regulada com HIBA (HIBA = ácido α -hidroxi-isobutírico). Quando este ligando se complexa, a carga global da espécie que se forma diminui, sendo esta diminuição tanto maior quanto maior fôr a tendência para se formarem complexos. Os iões lantanídeos mais pequenos são os de maior peso atómico e formam os complexos mais estáveis, pelo que são os primeiros a serem eluídos numa coluna de permuta catiónica.

Usando um agente complexante mais forte do que o HIBA no eluente (ex. oxalato), formam-se complexos aniônicos com os iões lantanídeos e estes já podem ser separados em colunas de permuta aniônica. Como os iões que formam complexos mais estáveis são os que têm carga global mais negativa, a ordem de separação é a inversa das separações por permuta catiónica.

Os métodos de separação dos iões metálicos de transição são bastante "robustos" e podem ser aplicados a amostras complexas sem ser necessário proceder a pré-tratamentos complicados (normalmente estes limitam-se a uma dissolução em meio ácido). Por esta razão este tipo de métodos tem sido utilizado na análise de iões metálicos numa grande variedade de amostras: fluídos

para arrefecimento em centrais nucleares [72], diversos fluídos em processos tecnológicos [73], urina [74], soro [75, 76], sangue [76], solos [77], soluções em indústrias de impressão de papel [78], águas de esgotos [79], banhos de electrólise [80], sumos e vinho [64]. Como se referiu, em alguns casos o reagente pós-coluna contém uma solução de PAR-Zn-EDTA, para melhorar a sensibilidade para alguns iões metálicos [61-77].

Deteção de lantanídeos usando compostos Arsenazo como reagentes pós-coluna

Cassidy e colaboradores [81-86] mostraram que os reagentes Arsenazo I e III são os ideais para a análise dos iões lantanídeos nos métodos com detecção espectrofotométrica após a reacção pós-coluna, pois esta é muito rápida à temperatura ambiente e a sensibilidade é boa e aproximadamente a mesma (cerca de 80 ppb) para todos os iões da série [81]. Este método de detecção tem sido utilizado na análise de amostras bastante complexas como rochas [82] e combustíveis de óxido de urânio [84, 86] em reactores nucleares. O processo separativo pode decorrer por cromatografia iónica ou por cromatografia de pares iónicos; em qual-

Tabela 4 - Alguns exemplos de reagentes para reacção pós-coluna para a detecção de catiões após separação por cromatografia iónica (adaptado da ref.^a 4, pág. 404)

Iões	Reagentes PCR ^a	Modo de detecção ^b	Limite de detecção	Ref.
Al (III)	Oxina-5-sulfonato	Fluor (512 nm)	1 ppb	87
Al (III)	Tiron	Esp (310 nm)	50 ppb	88, 89
Ca (II), Mg (II)	Arsenazo I	Esp (590 nm)	2.6 ng	90
Ca (II), Mg (II)	Arsenazo I	Esp (570 nm)	50 ppb	60
Co (II)	Luminol	Fluor ^c	0.5 ppt	91, 92
Cr (III), Cr (IV)	DPC	Esp (520 nm)	1100 ppb	93
Fe (II), Fe (III)	PAR	Esp (520 nm)	80 ppb	94
Fe (II), Fe (III)	BPDSA	Esp (530 nm)	10 ppb	95
Zr (IV), Ga (III), Sc (III), Y (III), In (III), Al (III), La (III), Zn (II), Cd (II), Ca (II), Mg (II)	Oxina	Fluor (530 nm)	1-84 ng	96,97
Metais de transição	Ditizona	Esp (590 nm) ^d	2-10 ng	98
Metais de transição	NET	Esp (610 nm) ^d	2-10 ng	98
Sn (butil) ₃	Morin	Fluor (534 nm)	16 ng (Sn)	99

a - DPC = difenilcarbohidrazida, BPDSA = ácido batofenantrolina disulfónico, NET = negro de eriocromo T.

b - Esp = espectrofotometria; Fluor = fluorescência.

c - Os comprimentos de onda de excitação e de emissão não são especificados nos artigos.

d - Método de detecção indirecta.

quer dos casos podem usar-se técnicas de eluição com gradientes, mas tem-se obtido melhor resolução no método de cromatografia de pares iónicos com colunas de fase reversa C₁₈. Com o arsenazo III como reagente derivatizante e detecção a 658 nm, Cassidy [81] afirma poderem ser quantificados com relativa facilidade concentrações da ordem dos 100 ppb.

Na figura 8C apresenta-se um cromatograma obtido com uma coluna de permuta catiónica, em que a selectividade para os vários iões é regulada variando a concentração do ácido 2-metil-láctico, que actua como um agente complexante relativamente fraco, de forma semelhante ao exemplo que se apresentou na fig. 8B.

Outros reagentes pós-coluna

Tem sido utilizada uma grande variedade de reagentes pós-coluna para a detecção espectrofotométrica (ou por fluorescência) de catiões. Estes são normalmente úteis apenas para análises específicas, com o ob-

jectivo de ter uma melhor sensibilidade para um ião metálico ou um grupo restrito de iões metálicos, não tendo as características de universalidade do PAR e dos Arsenazos I e III.

Na tabela 4 apresentam-se alguns dos reagentes que têm sido utilizados, bem como uma ordem de grandeza dos limites de detecção determinados. Em alguns casos está em jogo uma detecção indirecta. Por exemplo, ajustando o comprimento de onda de detecção para a banda de absorção da ditizona ou do negro de eriocromo T, quando os complexos dos iões metálicos com estes reagentes passam na célula do detector, o sinal diminui [98].

CROMATOGRAPHIA IÓNICA DE SUBSTITUIÇÃO

Um caso particular das técnicas que envolvem reacções pós-coluna é a cromatografia iónica de substituição (R.I.C. = replacement ion chromatography).

Neste método, que tem aplicação universal e pode apresentar limi-

tes de detecção bastante bons, os solutos que saem da coluna separativa passam a uma outra unidade em que, por um mecanismo de permuta iónica (normalmente), são substituídos por outro ião para o qual o detector responde de uma forma mais eficiente.

Este método foi desenvolvido inicialmente para a análise de aniões ou catiões com um detector fotométrico de chama [100], utilizando uma coluna de substituição em que os catiões da banda do soluto são substituídos por iões Li⁺, o qual pode ser detectado por fotometria de chama com maior sensibilidade do que os iões da amostra com a maioria dos outros detectores.

Solutos que absorvem pouco no UV podem ser detectados por este método [101] e algumas das características a ter em conta são:

1. A técnica de substituição permite a utilização de um método de detecção mais adequado e não apenas aquele(s) a que os solutos da amostra são sensíveis. Podem usar-se

detectores mais sensíveis e menos susceptíveis a flutuações de temperatura do que o condutimétrico (como pode ser o caso do detector espectrofotométrico),

2. O ião de substituição deverá ter menor afinidade pelos locais de permuta do reactor de substituição do que os solutos,

3. É conveniente que o ião de substituição seja monovalente de maneira a maximizar-se o sinal do detector,

4. O reactor de substituição deverá operar em contínuo, eficiente e reprodutivelmente e ter um volume vazio muito pequeno. Neste contexto os reactores de membrana, como as fibras ocas, são o ideal,

5. Em primeira aproximação a área das bandas deve ser a mesma para todos os solutos, pois cada um é estequiometricamente convertido num único ião detectável. Nestas condições a CI de substituição constitui uma técnica de detecção universal, com a vantagem de haver uma única curva de calibração aplicável a todos os solutos com a mesma carga,

6. O método tem como principais desvantagens o alargamento das bandas devido à introdução de uma unidade que tem um volume vazio apreciável e à maior complexidade do equipamento necessário.

A cromatografia iónica de substituição pode ser aplicada à detecção de aniões e catiões usando sistemas de supressão convencionais [1], seguidos de colunas ou reactores de membrana continuamente regeneradas, nas quais ocorre o processo de substituição, o qual envolve reacções de permuta iónica (vd. fig. 9). Os reactores de membrana têm-se revelado sempre superiores às colunas, no que respeita à eficiência do processo de substituição, mesmo quando se usam membranas relativamente curtas, ex. 10 cm [7].

Têm sido utilizados principalmente os seguintes três modos de CI de substituição [7]:

1. Substituição dos iões H^+ associados ao anião do eluente por um catião fluorescente, por exemplo o $Ce(III)$, por permuta catiónica,

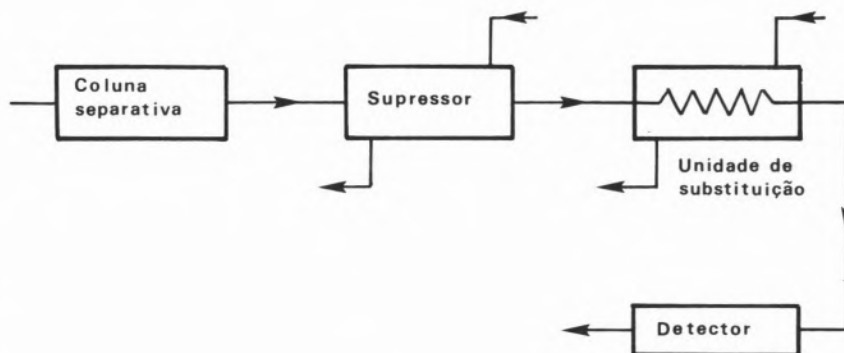


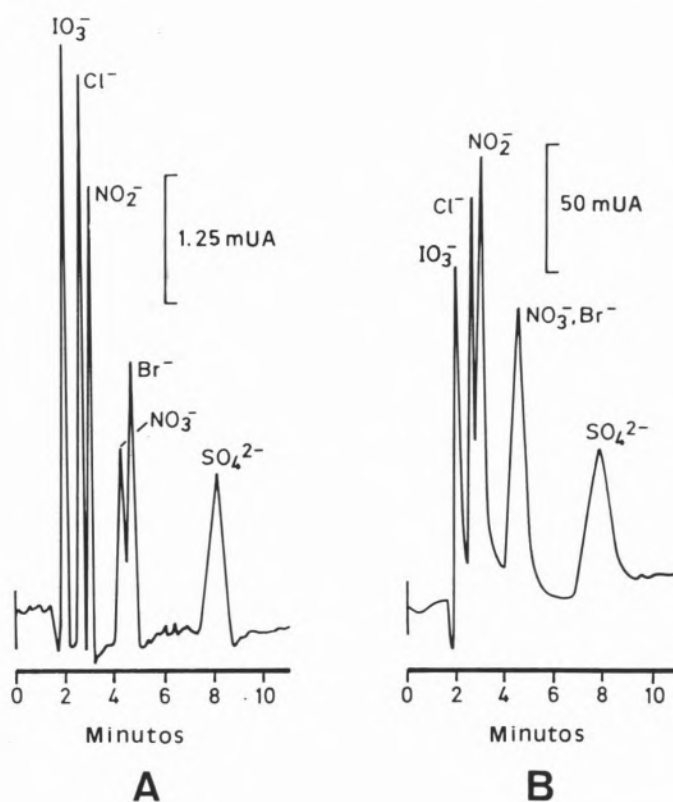
Fig. 9 - Diagrama indicando a sequência das unidades em CI de substituição. Tipicamente a unidade de substituição consiste num tubo de um permutador de iões (membrana), com diâmetro da ordem de 300 a 1100 μm que, ou está mergulhado numa solução contendo o ião de substituição, ou esta circula no exterior do tubo dentro de outro tubo concêntrico com este [102].

2. Substituição do anião do eluente por um anião com grande absorvidade ou fluorescente, por exemplo o 2-aminobenzonato [102], por permuta aniónica,

Fig. 10 - Exemplos de cromatogramas de aniões obtidos por CI de substituição com detecção espectrofotométrica [102]. Condições: coluna Dionex HPIC-AS4A; eluente (1 ml/min): KOH (25 mM) e injeção de uma amostra contendo 5 nmol de cada ião.

(A) Substituição por $Ce(III)$ com uma solução de sulfato de cério (0.5 mM), em tubo de Nafion 815X de 10 cm de comprimento e 1000 μm de diâmetro, empacotado com partículas de 10 μm . Detecção espectrofotométrica a 256 nm.

(B) Substituição por iões 2-aminobenzoato com uma solução de ácido 2-aminobenzoico (10 mM), em tubo de PTFE de 15 cm de comprimento e 1100 μm de diâmetro, empacotado com partículas de 300 μm .



3. Inibição da libertação de uma amina (base fraca) fluorescente, por exemplo o 2-aminobenzonato que, ou está retida numa resina de permuta catiónica, ou é transportada para o eluente através de uma membrana de permuta catiónica, pelos eluentes ácidos.

Os modos 1 e 2 originam sinais positivos enquanto que o modo 3 produz um sinal negativo.

No modo (1) os iões H^+ introduzidos no efluente da coluna no supressor podem ser permutados por iões $Ce(III)$ na unidade de substituição, os quais são então detectados espectrofotometricamente a 256 nm ou por fluorescência utilizando um comprimento de onda de excitação de 254 nm (emissão de lâmpada de mercúrio). Na fig 10(A) apresenta-se um exemplo de um cromatograma obtido com detecção espectrofotométrica. Os limites de detecção são melhores do que na detecção condutimétrica [102], especialmente na detecção por fluorescência.

Na análise de aniões os solutos podem ser substituídos por outro anião, por exemplo o 2-aminobenzonato, modo (2), o qual pode ser seguidamente detectado espectrofotometricamente a 210 nm ou por fluorescência, podendo neste caso serem utilizadas várias combinações para os comprimentos de onda de excitação e de emissão [102]. Na fig. 10(B) apresenta-se um exemplo de detecção de alguns iões inorgânicos. Os limites de detecção são melhores do que na detecção por fluorescência do $Ce(III)$, mas a deterioração das membranas utilizadas na unidade de substituição constitui um sério inconveniente da técnica [102].

Na análise de catiões por CI de substituição pode ser utilizado ácido nítrico como eluente e os iões OH^- introduzidos no supressor (fig. 9) podem ser substituídos por IO_3^- [101], NO_3^- [101], I^- [103] ou β -naltalenosulfonato [103], seguido de detecção espectrofotométrica a um comprimento de onda adequado. Os limites de detecção para catiões monovalentes são da ordem de 50-750 ppb (para injecções de 20 μ l de

amostra) quando se usa IO_3^- como ião de substituição e cerca de duas vezes melhor quando se usa NO_3^- [101].

DETERMINAÇÃO DE IÕES ORGÂNICOS POR REACÇÃO PÓS-COLUNA APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAPHIA IÓNICA

Muitas das separações de compostos orgânicos ionizáveis é feita por cromatografia em fase reversa ou por mecanismos de exclusão de iões, decorrendo o processo separativo em condições tais que a sua ionização é suprimida. Nalguns casos a separação é feita por CI mas a detecção é condutimétrica, espectrofotométrica, fluorimétrica, ou por métodos electroquímicos, não envolvendo normalmente reacções pós-coluna. Não se vão enumerar exemplos de iões orgânicos que têm sido separados por CI e cuja detecção é feita após reacção pós-coluna, pois isso obrigaria a entrar em pormenores sobre cada caso particular e as refs. 4-19 dão um panorama mais do que suficientemente sobre a variedade de compostos analisados e técnicas utilizadas.

O exemplo mais conhecido e utilizado mais frequentemente na separação de iões orgânicos com detecção PCR é o da análise de aminoácidos. Este assunto por si só merecia um artigo ou mesmo um livro. Os aminoácidos podem ser separados em colunas de permuta catiónica ou aniónica, seguindo-se uma reacção pós-coluna com ninhidrina (NIN) e detecção espectrofotométrica a comprimentos de onda da ordem dos 570 nm, ou reacção pós-coluna com o-ftaldialdeído (OPA) e detecção por fluorescência com excitação a 230 ou 340-350 nm e detecção na gama 420-700 nm (é frequente a combinação 345/450 nm). Em qualquer dos casos é necessário um enrolamento ou um tubo empacotado com um sólido inerte, por exemplo esferas de vidro, para dar tempo a que a reacção se dê de forma significativa. No

caso do reagente ser a ninhidrina, a reacção ocorre a uma temperatura superior a 90° C e o reactor está inserido dentro de um forno. Como a reacção é muito lenta à temperatura ambiente há a possibilidade de adicionar a ninhidrina à fase móvel [104] não se dando a reacção durante a eluição. Provocando um aquecimento súbito à saída da coluna a reacção decorre a uma velocidade adequada sem ser necessária a existência das diversas unidades para a adição dos reagentes pós-coluna, diminuindo-se assim o alargamento das bandas.

Os aminoácidos secundários como a prolina, hidroxiprolina e sarcosina formam um derivado diferente, que tem o máximo de absorção a 440 nm, pelo que se a detecção destes compostos é importante, deve proceder-se de forma a que durante a eluição destes compostos o comprimento de onda seja o adequado.

A reacção com OPA só se dá com aminoácidos primários. No caso de se pretender também analisar os aminoácidos secundários, tem de se introduzir um outro reagente pós-coluna, hipoclorito de sódio, que oxida as aminas secundárias convertendo-as em aminas primárias [105]. À câmara de mistura em que se adiciona este reagente segue-se um enrolamento e posteriormente o efluente deste é misturado com a solução de OPA.

A análise de aminoácidos tem constituído um dos maiores desafios às técnicas de CI: é um problema de separação difícil, a ordem de eluição depende da selectividade da resina e do pH da fase móvel de uma forma nem sempre facilmente previsível e muito há ainda que aprender sobre este assunto [106]. Para uma discussão sobre alguns problemas que se põem e soluções que foram desenvolvidas para a separação de aminoácidos por CI com detecção PCR podem consultar-se, por exemplo as refs. [105-107].

Um outro conjunto de métodos alternativos de análise de aminoácidos consiste em proceder a reacções de derivatização pré-coluna, seguindo-se a separação dos derivados for-

mados, normalmente em colunas de fase reversa. Como reagentes de derivatização têm sido utilizados com frequência o OPA, o cloreto de dansilo, o FMOC ((9-fluorenilmetil)clo-roformato) e o feniltiocianato.

COMENTÁRIO FINAL

Os sistemas cromatográficos envolvendo reacções pós-coluna constituem alternativas para a análise de solutos que não são facilmente detectáveis pelas técnicas cromatográficas convencionais. Do ponto de vista operacional são de preferir os métodos que não requerem a adição de reagentes derivatizantes através de bombas.

O valor de um método analítico deve ser medido fundamentalmente pela forma como pode ser aplicado a amostras reais. Comparando técnicas recentes, pode dizer-se que a técnica correntemente mais utilizada para a análise de aniões é a CI. Para catiões as técnicas de espectroscopia de emissão de plasma (ICP) e absorção atómica (AAS) são as mais utilizadas, figurando a CI em 3º lugar [58], graças ao seu custo relativamente baixo e às interferências da matriz serem menos importantes. A fluorescência de raios X (sobre "papel") é um método utilizado em alguns laboratórios e a electroforese capilar está a surgir como técnica alternativa para a análise de iões, sendo especialmente adequada nos casos em que os outros métodos sejam de aplicação difícil ou muito dispendiosa.

As técnicas de detecção PCR são utilizadas com muita frequência e permitem atingir níveis de sensibilidade (e/ou selectividade) muito melhores do que outros métodos de CI que não envolvam reacção pós-coluna, sendo muito frequentemente desenvolvidos com base nestes sem alterar a metodologia de separação, já previamente optimizada. O preço a pagar por isto é a necessidade de instrumentação mais complexa e em muitos casos, um alargamento das bandas.

Em Portugal embora existam

muitas centenas de cromatógrafos a funcionar, as técnicas que envolvem detecção PCR não têm sido muito utilizadas. Por exemplo, enquanto que a técnica de derivatização pós-coluna com detecção espectrofotométrica tem sido utilizada com alguma frequência na análise em rotina de aminoácidos, não tem sido tão amplamente utilizada na análise de misturas de iões metálicos, apesar de os níveis que é possível detectar serem comparáveis (ou melhores) que os atingidos com a espectroscopia de absorção atómica ou de emissão de plasma [4, 58, 59]. A divulgação relativamente limitada das técnicas e instrumentação para a aplicação deste método, as dificuldades experimentais na adaptação de técnicas já desenvolvidas (que aliás também existem nos outros métodos alternativos), a existência de técnicas efectivamente competitivas, ou simplesmente hábitos adquiridos, talvez justifiquem este facto.

Um pouco relacionado com o que se acabou de referir, convém comentar que ao desenvolver um método de análise devem-se avaliar e ponderar devidamente quais os objectivos a atingir e os meios de que se dispõe ou que se pretendem adquirir. Na verdade, só se justifica usar um método de detecção pós-coluna se as técnicas que envolvam detecção directamente ao efluente da coluna não se afiguram satisfatórias para o fim em vista. Por exemplo, na análise do nitrato, a determinação espectrofotométrica directa é tão simples que, se o objectivo é, por exemplo, determinar este ião em águas de mesa, não faz sentido tentar desenvolver métodos mais complexos. Ocasionalmente sucede também que aparecem novos métodos com detecção directa, que tornam obsoletas técnicas com detecção PCR que, antes destas aparecerem, eram as mais adequadas.

Os horizontes da CI continuam a expandir-se e a detecção PCR ocupa um lugar cada vez mais importante, tendo a introdução de novas reacções químicas tido um papel importante nesta expansão.

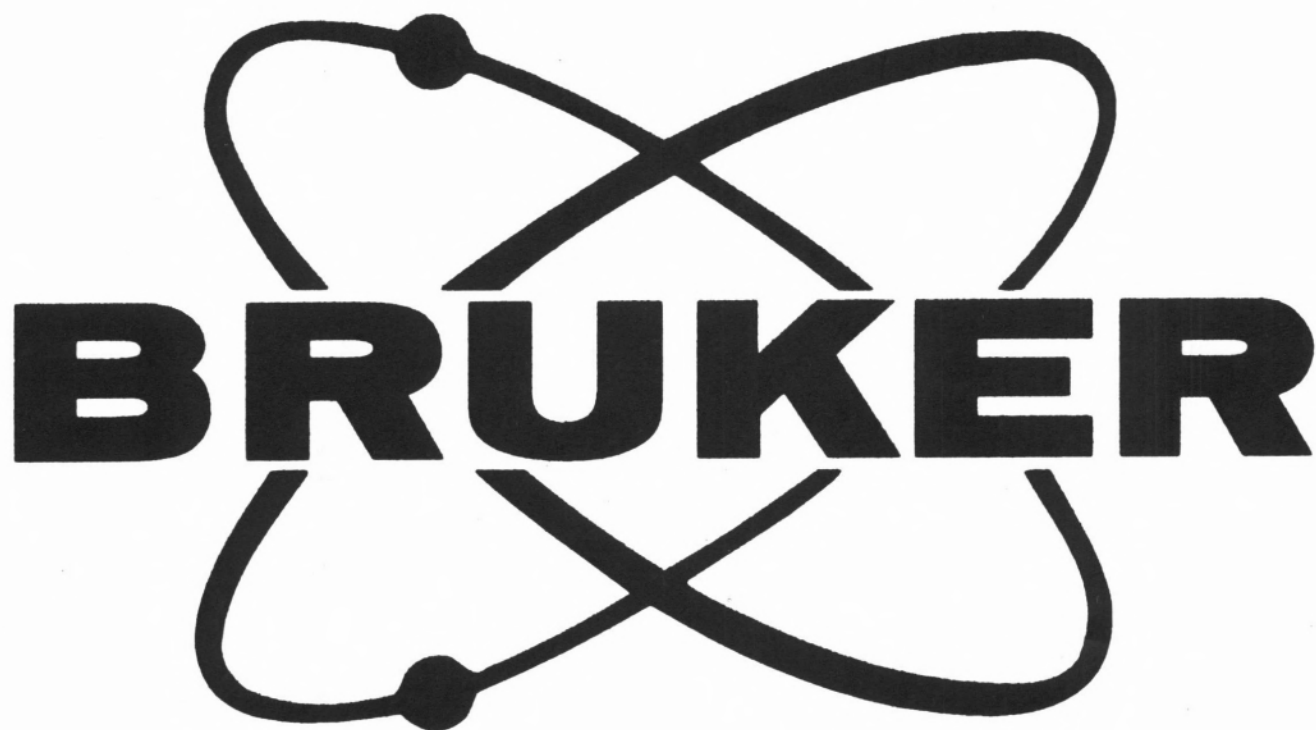
Dentro dos campos prováveis para o desenvolvimento futuro da detecção PCR podem referir-se o da detecção por técnicas de quimiluminescência e o da aplicação da detecção PCR em sistemas de HPLC miniaturizados, a qual poderá ocorrer em paralelo com o desenvolvimento da detecção PCR aplicada às técnicas de electroforese capilar [7, 108]. Pelo menos os reactores tubulares abertos e os empacotados parecem ser adequados como sistemas que asseguram um grau de conversão razoável sem alargamento intolerável das bandas [5, 109]. Um dos grandes problemas nestes sistemas de HPLC tem sido a construção de câmaras de mistura adequadas. Nestas condições os sistemas de reacção pós-coluna em que o reagente de derivatização é gerado no seio da fase móvel, por processos de fotólise, electroquímicos, termo-sensíveis ou outros, poderão ser um campo de desenvolvimento promissor.

* Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, 1096 LISBOA CODEX

BIBLIOGRAFIA

1. J. Costa Pessoa, *Técnica*, (1994), nº 1, 63.
2. (a) J. Costa Pessoa, *Técnica*, **3** (1994) 67.
(b) J. Costa Pessoa, *Técnica*, **1** (1995) 47.
3. R.W. Frei, *J. Chromatogr.* **165** (1979) 75.
4. P.R. Haddad e P.E. Jackson, *Ion Chromatography. Principles and Applications*, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 46, capítulo 13, Elsevier, 1990.
5. R.W. Frei, H. Jansen, U.A.T. Brinkman, *Anal. Chem.* **57** (1985) 1529A.
6. P.K. Dasgupta, *Approaches to Ionic Chromatography*, em *Ion Chromatography*, J.G. Tarter (editor), Marcel Dekker, 1987, pp. 191-367.
7. P.K. Dasgupta, *J. Chromatogr. Sci.* **27** (1989) 422.
8. *Reaction Detection in Liquid Chromatography*, I.S. Krull (editor), *Chromatogr. Sci. Ser.*, Vol. 34, Marcel Dekker, 1986.
9. U.A.T. Brinkman, *Chromatographia* **24** (1987) 190.
10. P.R. Haddad, *Chem. N.Z.* **51** (1987) 155.
11. P.R. Haddad, *Chromatographia* **24** (1987) 217.
12. W. Schleich, H. Engelhardt, *GIT Fachz. Lab.* **32** (1988) 401.
13. M.V. Pickering, *LC.GC* **6** (1988) 994.
14. (a) J.T. Stewart, W.J. Bachman, *Trends Anal. Chem.* **7** (1988) 106;

- (b) J.T. Stewart, W.J. Bachman, *LC-GC* **7** (1988) 38.
15. N.D. Danielson, M.A. Targrove, B.E. Miller, *J. Chromatogr. Sci.* **26** (1988) 362.
16. J.F.K. Huber, K.M. Jonker, H. Poppe, *Anal. Chem.* **52** (1980) 2.
17. R.W. Frei em *Chemical Derivatization in Analytical Chemistry*, Vol. 1: *Chromatography*, R.W. Frei e J.F. Lawrence (editores), Cap. 4, Plenum Press, 1981.
18. E.J. Woolf, *Post-Column Derivatization Techniques*, em a *Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriot (editores), Academic Press, 1993, págs. 211-232.
19. T.D. Schlabach, R. Weinberger, *Reaction Detection in Liquid Chromatography*, I.S. Krull (editores), *Chromatographic Science Series*, Vol. 34, Marcel Dekker, 1986.
20. R.M. Cassidy, S. Elchuk, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* **59** (1987) 85.
21. S. Elchuk, R.M. Cassidy, *Anal. Chem.* **51** (1979) 1434.
22. G.J. Schmidt, R.P.W. Scott, *Analyst (London)* **109** (1984) 997.
23. B. Lillig, H. Engelhardt, *Reaction Detection in Liquid Chromatography*, I.S. Krull (editores), *Chromatographic Science Series*, Vol. 34, Marcel Dekker, 1986.
24. K. Hoffmann, I. Halasz, *J. Chromatogr.* **173** (1979) 211.
25. R. Tijssen, *J. Chromatogr.* **114** (1980) 71.
26. J.H.M. Van Den Berg, R.S. Deelder, H.G.M. Egberink, *Anal. Chim. Acta* **114** (1980) 91.
27. R.S. Deelder, M.G.F. Kroll, A.J.B. Beeren, J.H.M. Van Den Berg, *J. Chromatogr.* **149** (1978) 669.
28. H. Engelhardt, U.D. Neue, *Chromatographia* **15** (1982) 403.
29. J.R. Poulsen, K.S. Kirks, M.S. Gandelman, J.W. Birks, *Chromatographia* **22** (1986) 231.
30. C.M. Selavka, K.S. Jiao, I.S. Krull, *Anal. Chem.* **59** (1987) 2221.
31. ICT-ASS-Chem., Document 8/93, *Beam-Boost Photochemical Reaction Unit*, e refs. aí citadas (94).
32. S.K. Rathawongs, S.R. Crouch, *Anal. Chim. Acta* **192** (1987) 277.
33. C.A. Lucy, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 107.
34. L.R. Snyder, *J. Chromatogr.* **125** (1976) 287.
35. S.T. Colgan, I.S. Krull, *Reaction Detection in Liquid Chromatography*, I.S. Krull (editores), *Chromatographic Science Series*, Vol. 34, Marcel Dekker, 1986.
36. D.T. Gjerde, J.S. Fritz, *Ion Chromatography*, Dr. Alfred Hüthig Verlag, 2ª ed., 1987.
37. J.C. Davis, D.P. Peterson, *Anal. Chem.* **57** (1985) 768.
38. J. Haginaka, *Bunseki* 1988, 131.
39. N. Yoza, T. Miyaji, Y. Hirai, S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **283** (1984) 89.
40. J. Weiss, G. Hagele, *Fres. Z. Anal. Chem.* **328** (1987) 46.
41. T. Toida, T. Togawa, S. Tanabe, T. Imanari, *J. Chromatogr.*, 1984, 308, 133.
42. Dionex Application Note 44R.
43. Waters IC Lab. Report No. 309.
44. N. Yoza, K. Ito, Y. Hirai, S. Ohashi, *J. Chromatogr.* **196** (1980) 471.
45. Y. Hirai, N. Yoza, S. Ohashi, *J. Chromatogr.* **206** (1981) 501.
46. W. Buchberger, *J. Chromatogr.* **439** (1988) 129.
47. W. Buchberger, K. Winsauer, *Mikrochim. Acta* **1985 III** (1986) 347.
48. T. Imanari, S. Tanabe, T. Toida, T. Kawanishi, *J. Chromatogr.* **250** (1982) 55.
49. S.H. Lee, L.R. Field, *Anal. Chem.* **56** (1984) 2647.
50. S.E. Meek, D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1397.
51. G. Tschabunin, P. Fischer, G. Schwedt, *Fres. Z. Anal. Chem.* **333** (1989) 117.
52. E. Vaeth, P. Sladek, K. Kenar, *Fres. Z. Anal. Chem.* **329** (1987) 584.
53. R. Goguel, *Anal. Chem.* **41** (1969) 1034.
54. Dionex Application Update 113.
55. K. Brunt, *Anal. Chem.* **57** (1985) 1338.
56. A. Nakae, K. Furuya, T. Mikata, M. Yamanaka, *Nippon Kagaku Kaishi* (1977) 1655.
57. A. Nakae, K. Furuya, T. Mikata, M. Yamanaka, *Nippon Kagaku Kaishi* (1976) 1426.
58. H.H. Willard, L.L. Merritt, Jr., J.A. Dean, F.A. Settle, Jr., *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Wadsworth Publ. Co., 7ª Ed., 1988, p. 644.
59. - P. Jandik, W.R. Jones, A. Weston, P.R. Brown, *LC/GC Intl* **5** (1992) 20.
60. H. Nagashima, *Bunseki Kagaku* **35** (1986) 7.
61. M.D. Arguello, J.S. Fritz, *Anal. Chem.* **49** (1977) 1595.
62. D. Yan, G. Schwedt, *Fres. Z. Anal. Chem.* **320** (1985) 325.
63. D. Yan, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta* **178** (1985) 347.
64. D. Yan, E. Stumpp, G. Schwedt, *Fres. Z. Anal. Chem.* **322** (1985) 474.
65. D. Yan, J. Zhang, G. Schwedt, *Fres. Z. Anal. Chem.* **331** (1988) 601.
66. G. Schwedt, *GI T Fachz. Lab.* **7** (1985) 697.
67. D.R. Yan, G. Schwedt, *Fres. Z. Anal. Chem.* **327** (1987) 503.
68. G.J. Sevenich, J.S. Fritz, trabalhos não publicados; de G.J. Sevenich, PhD Thesis, Iowa State Univ., 1984; referido em 36..
69. R.M. Cassidy, S. Elchuk, *J. Chromatogr. Sci.* **18** (1980) 217.
70. Dionex Ion Chromatography Cookbook, 1987, Doc. 328617/87.
71. W. Wang, Y. Chen, M. Wu, *Analyst* **109** (1984) 281.
72. R.M. Cassidy, S. Elchuk, *J. Liq. Chromatogr.* **4** (1981) 379.
73. J.J. Byerley, J.M. Scharer, G.F. Atkinson, *Analyst (London)* **112** (1987) 41.
74. M. Blaszkewicz, G. Baumhoer, B. Neidhart, R. Ohlendorf, M. Linscheid, *J. Chromatogr.* **439** (1988) 109.
75. M. Takayanagi, T. Yashiro, *J. Chromatogr.* **374** (1986) 378.
76. C.N. Ong, H.Y. Ong, L.H. Chua, *Anal. Biochem.* **173** (1988) 64.
77. Waters IC Lab. Report No. 272.
78. Waters IC Lab. Report No. 273.
79. Waters IC Lab. Report No. 276.
80. Wescan Application nº 283.
81. D.J. Barkley, M. Blanchette, R.M. Cassidy, S. Elchuk, *Anal. Chem.* **58** (1986) 2222.
82. R.M. Cassidy, *Chem. Geol.* **67** (1988) 185.
83. R.M. Cassidy, M. Fraser, *Chromatographia* **18** (1984) 369.
84. R.M. Cassidy, S. Elchuk, N.L. Elliot, L.W. Green, C.H. Knight, B.M. Recoskie, *Anal. Chem.* **58** (1986) 1181.
85. R.M. Cassidy, F.C. Miller, C.H. Knight, J.C. Roddick, R.W. Sullivan, *Anal. Chem.* **58** (1986) 1389.
86. C.H. Knight, R.M. Cassidy, B.M. Recoskie, L.W. Green, *Anal. Chem.* **56** (1984) 474.
87. P. Jones, L. Ebdon, T. Williams, *Analyst (London)* **113** (1988) 641.
88. P.M. Bertsch, M.A. Anderson, *Anal. Chem.* **61** (1989) 535.
89. Dionex Application Note 42.
90. D.L. Smith, J.S. Fritz, *Anal. Chim. Acta* **204** (1988) 87.
91. E.A. Boyle, B. Handy, A. Van Geen, *Anal. Chem.* **59** (1987) 1499.
92. P. Jones, T. Williams, L. Ebdon, *Anal. Chim. Acta* **217** (1989) 157.
93. Dionex Application Note 26.
94. C.O. Moses, A.T. Herlihy, J.S. Herman, A.L. Mills, *Talanta* **35** (1988) 15.
95. H. Saitoh, K. Oikawa, *J. Chromatogr.* **329** (1985) 247.
96. B.D. Karcher, I.S. Krull, *J. Chromatogr. Sci.* **25** (1987) 472.
97. B.D. Karcher, I.S. Krull, R.G. Schleicher, S.B. Smith, Jr., *Chromatographia* **24** (1987) 705.
98. P.J. Hobbs, P. Jones, L. Ebdon, *Anal. Proc.* **20** (1983) 613.
99. L. Ebdon, J.I.G. Alonso, *Analyst (London)* **112** (1987) 1551.
100. S.W. Downey, G.M. Hieftje, *Anal. Chim. Acta* **153** (1983) 1.
101. L.J. Galante, G.M. Hieftje, *Anal. Chem.* **60** (1988) 995.
102. H. Shintani, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* **59** (1987) 1963.
103. T. Takeuchi, E. Suzuki, D. Ishii, *Chromatographia* **25** (1988) 582.
104. J.N. LePage, E.M. Rocha, *Anal. Chem.* **55** (1983) 1360.
105. M. Fujiwara, Y. Ishida, N. Nimura, A. Toyama, T. Kinoshita, *Anal. Bioch.* **166** (1987) 72.
106. H. Small, *Ion Chromatography*, Plenum Press, 1989, págs. 236-242.
107. Dionex Corporation, *BioLC Series Amino Acid Analysis System*, Dionex Corporation, Sunnyvale, California, 1988.
108. P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* **64** (1992) 775 A.
109. H. Jansen, U.A. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.* **23** (1985) 279.



NMR : EPR : FT-IR : MS

AGORA, EM PORTUGAL
É



DIAS DE SOUSA LDA

INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA E CIENTÍFICA

QUINTA DA PIEDADE, LOTE 15, R/C - 2625 PÓVOA DE STA. IRIA - TEL. (01)959 2316, 959 24 09 - FAX (01)959 0813
RUA GONÇALO CRISTÓVÃO, 294, 7.º ET - 4000 PORTO - TEL. (02)310839, 208 24 90 - FAX (02)32 35 73
CANADA DOS FOLHADAIS, N.º 15 - 9700 ANGRA DO HEROÍSMO - AÇORES - TEL. (095)325 12 - FAX (095)313 38