

## UM EQUIPAMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA CONSTRUÍDO EM LABORATÓRIO

Wolmir J. Böckel, Emilse M. A. Martini, Dimitrios Samios e Clarisse M. S. Piatnicki\*

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 Porto Alegre - RS

Recebido em 11/8/04; aceito em 30/3/05; publicado na web em 24/8/05

A LABORATORY-MADE CAPILLARY ELECTROPHORESIS EQUIPMENT WITH CONDUCTOMETRIC DETECTION. A new construction of a capillary electrophoresis instrument with a universal conductivity detector (oscillometric detector) is described. The performance of the electrophoresis equipment was evaluated through the separation and detection of inorganic anions and cations in aqueous solutions. The results reproduced those found in the literature for the investigated probe ions, showing an efficient separation and good repeatability.

Keywords: capillary electrophoresis instrument; oscillometric detector; inorganic ions.

### INTRODUÇÃO

A importância da eletroforese capilar (CE) na análise de misturas complexas decorre da alta eficiência de separação e da simplicidade do equipamento utilizado<sup>1</sup>. O processo de separação dos componentes da mistura, injetada em um eletrólito de corrida que flui através do capilar, consiste no deslocamento do soluto sob a ação de um campo elétrico. As partículas ou íons migram na direção do cátodo ou do ânodo em função de sua carga específica<sup>2</sup> e a separação ocorre das diferenças de mobilidade dos compostos iônicos ou ionizáveis presentes, da razão carga/volume das espécies e de fatores estruturais<sup>3,4</sup>. O eletroferograma, isto é, o registro gráfico do sinal do detector em função do tempo decorrido a partir da injeção da amostra, permite identificar e quantificar os componentes da mistura.

A análise por eletroforese tem sua origem no método da fronteira móvel<sup>5,6</sup>. Posteriormente, para evitar o processo de convecção devido à força gravitacional, o tubo de vidro foi substituído por uma tira de papel ou empacotado com um meio quimicamente estável como pó de vidro, celulose ou gel<sup>7</sup>. Por sua vez, o efeito de convecção causado pela geração de calor devido à passagem de corrente elétrica através da solução foi minimizado por Hjertén pela rotação de um capilar com 3 mm de diâmetro interno (d.i.). Desde então disseminou-se o uso de capilares com d.i. cada vez menor, o que permitiu aumentar a intensidade do campo elétrico sem necessidade de rotação do capilar<sup>8</sup>. Em 1981, Jorgenson e Lukacs<sup>9</sup> utilizaram capilares com 75 µm de d.i. dando origem à eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE). Pouco depois, Terabe e colaboradores<sup>10</sup> empregaram como meio de separação uma fase pseudo-estacionária constituída de micelas, estabelecendo as bases da cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC).

A escolha do método de detecção na eletroforese capilar depende, entre outros fatores, da compatibilidade do detector com as dimensões do capilar. Tradicionalmente, tem sido empregada a espectrometria de absorção molecular no UV-visível e, mais recentemente, a espectrometria de massas<sup>11</sup>. Por outro lado, as técnicas de detecção eletroquímica são especialmente adequadas à

determinação de analitos que não são detectáveis por métodos ópticos<sup>1,12-14</sup> e quando são empregados tampões biológicos, que absorvem fortemente na região do ultra-violeta<sup>15</sup>. Para minimizar a interferência do elevado campo elétrico empregado na separação dos analitos no potencial do eletrodo de trabalho, emprega-se um desacoplador. Este consiste basicamente de uma fenda feita próxima da extremidade do capilar e coberta com um material poroso<sup>1</sup>. Este tipo de detecção apresenta como inconvenientes<sup>13,14,16,17</sup> a geração de gás no eletrólito de corrida, o maior tempo necessário para limpeza do eletrodo, seu alinhamento em relação à extremidade do capilar e sua calibração. O método eletroquímico mais freqüentemente utilizado é a amperometria<sup>1,18</sup>, porém, a detecção potenciométrica é extremamente útil na determinação de ânions não eletroativos<sup>14</sup>. No método condutométrico, um potencial senoidal de alta freqüência (daí a origem do termo "oscilométrico") é aplicado à célula, medindo-se a corrente elétrica resultante que é função da condutividade da solução. Os eletrodos da célula condutométrica constituem um capacitor enquanto a solução atua como uma resistência cujo valor depende de sua condutividade elétrica. A detecção condutométrica foi empregada por Jensen e Parrack em análise titulométrica<sup>19</sup> e por Vacík e colaboradores<sup>20</sup> na separação de ânions inorgânicos<sup>21,22</sup>. Um detector oscilométrico desenvolvido por Fracassi da Silva e Lago<sup>23</sup> opera com freqüência de 600 kHz e 20 V pico-a-pico entre dois eletrodos cilíndricos distantes 1 mm entre si, os quais são construídos pintando-se duas faixas com tinta à base de prata sobre a superfície de um capilar, perpendicularmente ao seu eixo. Por sua versatilidade, o campo de aplicação da detecção oscilométrica em eletroforese capilar tem crescido intensivamente<sup>21,24-29</sup>.

A simplicidade do equipamento de eletroforese e o baixo custo dos componentes, relativamente a outros equipamentos analíticos, tornam possível sua construção em laboratório, com a vantagem sobre os equipamentos comerciais de permitir modificações e adaptações. É de interesse destacar que o desenvolvimento de métodos de análise por eletroforese capilar empregando componentes de dimensões micrométricas<sup>30</sup> atende à tendência atual de miniaturização dos sistemas analíticos instrumentais<sup>31</sup>.

Os objetivos deste trabalho são descrever a construção em laboratório de um equipamento de eletroforese capilar e de um detector oscilométrico e verificar seu desempenho na separação de ânions e de cátions inorgânicos.

\*e-mail: clarisse@iq.ufrgs.br

## PARTE EXPERIMENTAL

Na preparação das soluções empregou-se água destilada e deionizada utilizando um equipamento da Barnstead® modelo Easy pure LF com resistividade de 18,3 MΩ cm. As soluções estoque para análise de cátions e de ânions foram preparadas na concentração 1000 mg kg<sup>-1</sup> a partir de NaCl p.a. 99,5% e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. 99,0%, ambos de procedência Merck, NaBr 99,5%, da Vetec e KNO<sub>3</sub> p.a., da Nuclear. Na preparação do eletrólito de corrida empregaram-se soluções 0,1 mol L<sup>-1</sup> de histidina base livre (His), da Merck, e de ácido 2-N-morfolino etanossulfônico (MES), da Acros, ambos com 99% de pureza. As soluções foram armazenadas a 10 °C e ao abrigo da luz.

O condicionamento do capilar foi feito em fluxo aplicando-se uma pressão de -250 mmHg na extremidade próxima ao detector. Empregou-se primeiramente NaOH (grau analítico, de procedência Nuclear), na concentração 1 mol L<sup>-1</sup>, durante 15 min, seguido de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 15 min, água destilada e deionizada por 5 min e, finalmente, solução do eletrólito de corrida por 15 min. A vedação do reservatório no qual estão inseridos o eletrodo e o capilar foi feita através de um septo confeccionado no laboratório com borracha de silicone de procedência Colaflex Química Indústria e Comércio Ltda. A reposição do eletrólito no capilar foi realizada mediante aplicação de vácuo, nas mesmas condições descritas acima e, em seguida, aplicou-se um potencial de 15 kV até a estabilização do sinal da linha de base (em torno de 5 min).

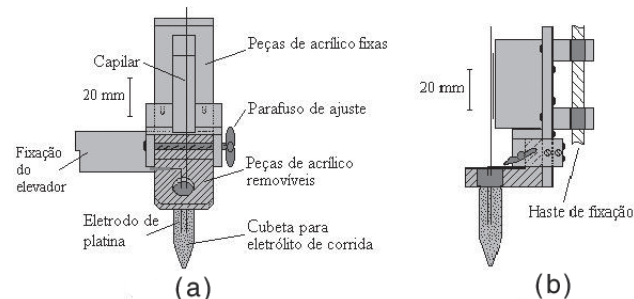
Para a fixação de componentes do equipamento empregaram-se uma cola condutora à base de prata da Gaúcha Comércio de Relógios e Fornituras Ltda e um adesivo à base de poliuretano, marca Araldite, de procedência Brascola Ltda.

## COMPONENTES E DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

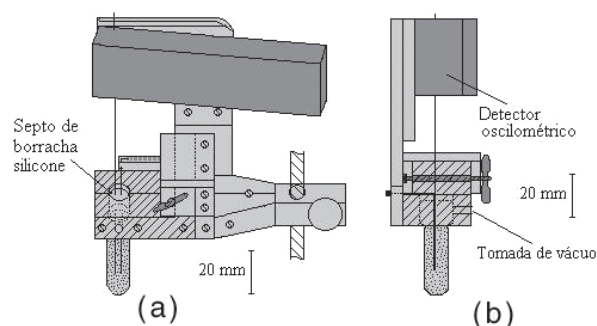
Na construção do equipamento de eletroforese capilar, incluindo o detector oscilométrico e os sistemas para injeção de amostras e controle de temperatura, foram empregados os seguintes instrumentos, peças e componentes eletrônicos: uma fonte de alta tensão 0-15 kV modelo 602C-150P da marca Bertan; um osciloscópio tipo OS-60 de 60 MHz da marca WGB; um controlador de temperatura modelo N480, um temporizador modelo NT240, um relé de estado sólido tipo KSD 210 AC8 e um sensor de temperatura PT 100, todos de procedência Novus; um ventilador de fonte alimentadora Power Fan Dc Brushless 12 V e 0,13 A, modelo THS 182M; um gerador de funções modelo 420 de procedência Simpson; dois amplificadores operacionais OPA 606 KP, um amplificador operacional LF 356, um potenciômetro de marca Spectrol, código 534-1-1 de 10 kΩ, de procedência Farnell do Brasil; um potenciostato da Eco Chemie B.V., modelo Autolab; programas para aquisição e tratamento de dados General Purpose Electrochemical System 4.8 (GPES) da Eco Chemie B.V. e Microcal Origin® 5.0 da Microcal Software; capilar de sílica fundida de diâmetros interno e externo, respectivamente, com 50 e 150 μm, de procedência Polymicro Technologies; um motor de tocafitas 12 V de EG-530AD-2B código CA 971205; um conjunto constituído de correia, eixo e carro de impressão de uma impressora Epson 4000; 5 relés de 5 pinos, 12 V, da marca Schrack; uma fonte de 12 V modelo MW 69 da International e fio de cobre comercial de 0,12 mm de diâmetro.

O equipamento foi montado em uma caixa de acrílico com dimensões de 60 x 40 x 22 cm para possibilitar a termostatização do ambiente interno e para a segurança do operador. A fonte de alta tensão, cujo valor máximo de saída é de 15 kV, aplica uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo, ambos de platina, cada um deles mergulhado juntamente com uma das extre-

midades do capilar em reservatórios (cubetas) contendo o eletrólito de corrida. O comprimento total do capilar foi de 60 cm com uma distância de 50 cm entre o ponto de injeção até o detector. Como mostrado nas Figuras 1 e 2, os suportes para a fixação das cubetas foram projetados visando a praticidade do manuseio, que envolve a troca do eletrólito, das soluções de limpeza e do próprio capilar.

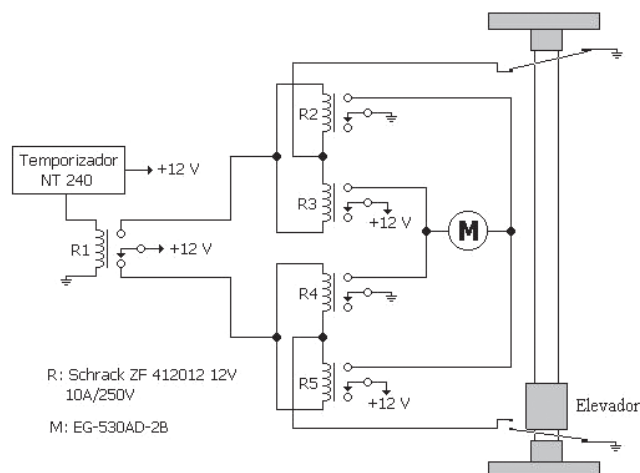


**Figura 1.** Suporte móvel de fixação da cubeta do eletrólito de corrida na extremidade do capilar onde é feita a injeção: (a) projeção de frente com inclinação de 45° da vertical e (b) projeção de lado



**Figura 2.** Suporte de fixação da cubeta na extremidade do capilar onde é feita a detecção: (a) projeção de frente com inclinação de 45° da vertical e (b) projeção de lado

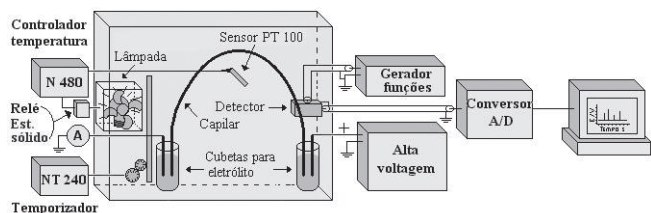
Para a injeção da amostra empregou-se um sistema hidrodinâmico em que a pressão sobre a solução do eletrólito é causada pela elevação da extremidade do capilar (100 mm durante 30 s), através de um sistema mecânico. Este foi construído a partir de partes de uma impressora e é constituído por um conjunto de relés e um elevador controlados por um temporizador, como mostra o diagrama elétrico da Figura 3.



**Figura 3.** Diagrama elétrico do sistema de injeção hidrodinâmica

O aquecimento por efeito Joule, tanto do capilar quanto da solução nele contida, muda drasticamente as condições de separação porque a mobilidade dos íons varia aproximadamente 2% por grau Celsius<sup>32</sup> e a viscosidade do meio diminui, tornando necessário o controle da temperatura do capilar para assegurar a repetibilidade dos resultados. Uma lâmpada colocada dentro de uma caixa de alumínio, provida de orifícios e de um ventilador para circulação do ar, permite amortecer a variação de temperatura dentro da caixa de acrílico. O ligar e desligar da lâmpada é controlado por um relé de estado sólido acoplado a um controlador de temperatura, a qual é monitorada por um sensor colocado próximo ao capilar (Figura 4). Para facilitar o controle da temperatura em todas as estações do ano seu valor foi fixado em  $28,0 \pm 0,5$  °C.

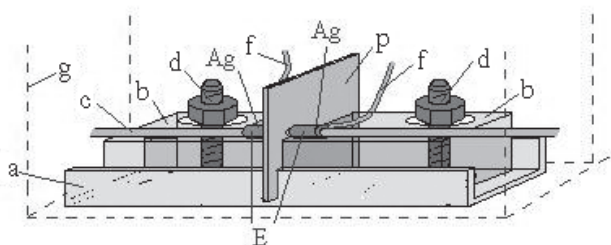
A Figura 4 mostra um diagrama de blocos do equipamento de eletroforese com todos os seus componentes.



**Figura 4.** Diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório

A construção do detector oscilométrico fundamenta-se no trabalho de Fracassi da Silva e Lago<sup>23</sup>, com algumas alterações relativas ao desenho da célula e à disposição dos componentes eletrônicos. Para isto foi utilizado um gerador de funções que fornece 15 V pico-a-pico,  $V_{pp}$  (voltagem pico-a-pico da onda senoidal correspondente ao potencial aplicado no detector), monitorando-se o sinal senoidal com auxílio de um osciloscópio.

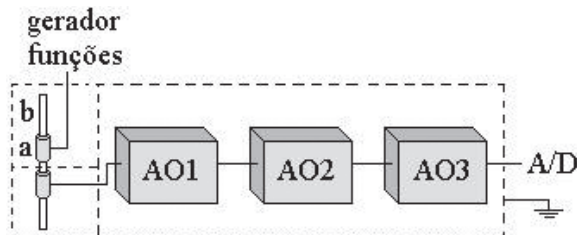
A Figura 5 mostra em detalhes a célula detectora, que é fixada a uma base de alumínio (a) sobre a qual se movimentam, independentemente uma da outra, duas placas de acrílico (b) ao longo do eixo do capilar (c). A movimentação das placas, cuja posição é fixada através de parafusos (d), permite a variação da distância entre os eletrodos. Em torno da superfície externa do capilar foram construídos dois eletrodos cilíndricos (e) com fios de cobre de 0,12 mm de espessura enrolados em espiral (sem espaçamento). Os eletrodos, fixados sobre as placas móveis com um adesivo à base de poliuretano, estão distantes 1 mm entre si, têm 2 mm de comprimento (definido pelo número de espiras) e 0,5 mm de diâmetro externo. Para evitar o comportamento indutivo dos eletrodos foi necessária a soldagem cuidadosa das espiras entre si. A ligação (f) entre os eletrodos e o circuito elétrico foi feita com uma cola



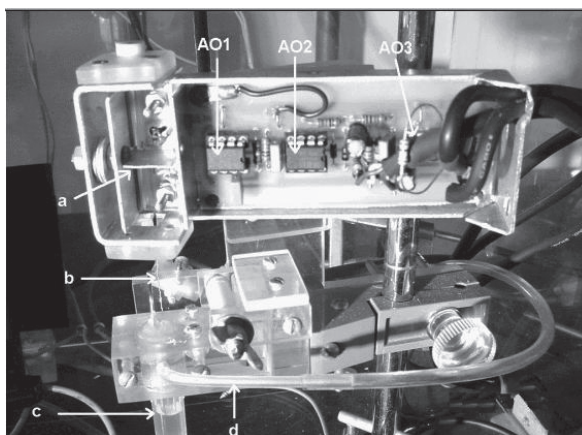
**Figura 5.** Célula de detecção oscilométrica: (a) base de alumínio; (b) placas de acrílico; (c) capilar de sílica; (d) parafusos de fixação; (e) eletrodos cilíndricos; (f) fios de entrada e saída do sinal; (g) carcaça do detector aterrada; (p) plano aterrado de alumínio e (Ag) solda prata a frio

condutora à base de prata (Ag na Figura 5). A fim de minimizar interferências, fez-se o aterramento (g) entre a célula detectora e os componentes eletrônicos do circuito bem como entre os eletrodos (plano p).

Nas Figuras 6 e 7 são mostrados, respectivamente, o diagrama de blocos e uma fotografia do detector oscilométrico.



**Figura 6.** Diagrama de blocos do detector oscilométrico: (a) eletrodos cilíndricos, (b) capilar, (AO) amplificadores operacionais AO1, AO2 e AO3 com as funções, respectivamente, de conversão I/V, retificação do sinal e amplificação do sinal retificado; (A/D) conversor de sinal analógico/digital



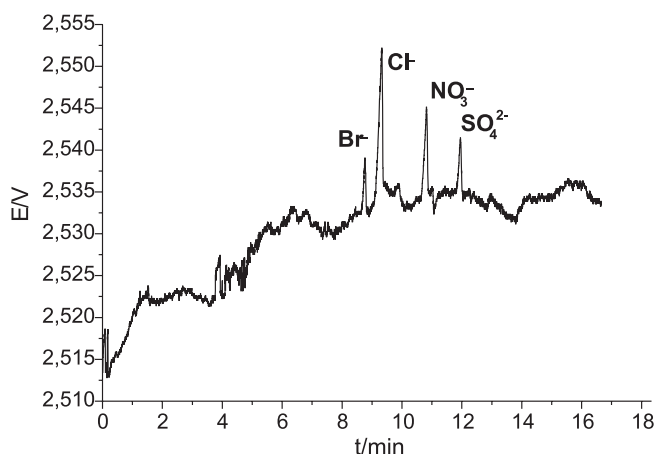
**Figura 7.** Fotografia do detector oscilométrico (sem a tampa): (a) plano aterrado; (b) capilar; (c) reservatório; (d) tomada de vácuo e (AO) amplificadores operacionais 1, 2 e 3

O sinal de alta frequência proveniente do gerador de funções é aplicado a um dos eletrodos, enquanto o outro é ligado a um amplificador operacional, AO1, que tem por função a conversão da corrente em voltagem e que está ligado em série aos amplificadores AO2 e AO3. Estes têm por função, respectivamente, a retificação e a amplificação do sinal recebido do AO1. Para a conversão analógico/digital (A/D) do sinal entre o amplificador AO3 e o terra utilizou-se a entrada analógica de um potenciostato que, desta forma, está operando como um voltímetro. Assim, os dados podem ser tratados usando-se o programa General Purpose Electrochemical System 4.8 (GPES) da Eco Chemie B.V..

## AVALIAÇÃO DO EQUIPAMENTO

### Separação de ânions

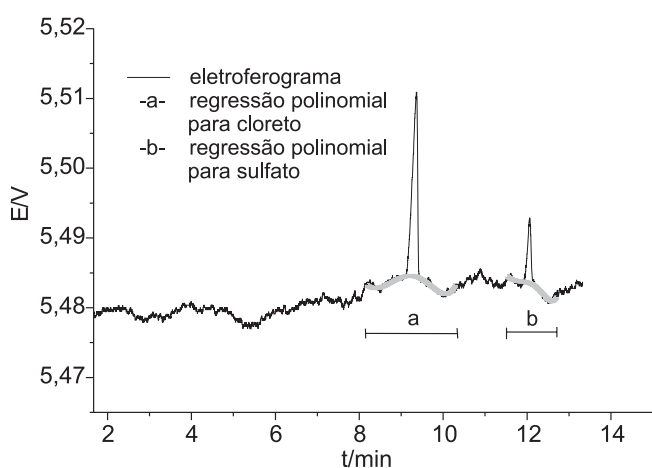
A separação dos íons brometo, cloreto, nitrato e sulfato foi realizada em uma mistura de MES e His, ambos na concentração  $2,0 \cdot 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, em contra-fluxo e com inversão de polaridade. No eletroferograma da Figura 8 observa-se uma boa resolução na separação e detecção destes ânions, em concordância com os resultados de Zemann e colaboradores<sup>33</sup>.



**Figura 8.** Eletroferograma da separação de uma mistura de íons brometo, cloreto, nitrato e sulfato na concentração  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  em MES e His, ambos na concentração  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Voltagem de  $15 \text{ kV}$  e frequência de  $550 \text{ kHz}$

### Relação sinal/ruído

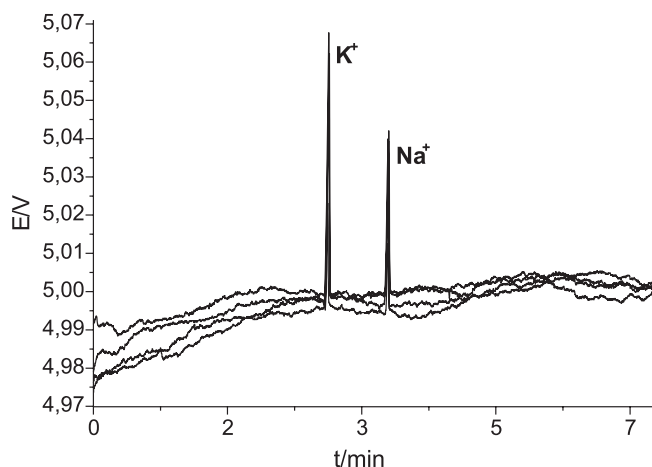
A relação sinal/ruído (RSR) foi determinada para as frequências de 200, 400, 500, 550 e 600 kHz. Para cada uma destas frequências são selecionadas, através do programa Microcal Origin® 5.0, centenas de pontos do eletroferograma nas regiões anterior e posterior a um pico, em uma extensão que corresponde a quatro vezes a largura da base do pico. Aplicam-se, então, a estes pontos equações polinomiais de ajuste, de graus um a nove, e seleciona-se a equação que apresentar o maior valor de  $R^2$  (coeficiente de determinação). Multiplicando por dois o desvio padrão do sinal da linha base que resulta desta equação, obtém-se o valor do ruído. A relação sinal/ruído é calculada pelo quociente entre a altura do pico (determinada através do programa GPES) e o ruído da linha base. A Figura 9 ilustra a determinação do ruído da linha base e a região da curva em torno dos picos dos íons cloreto e sulfato selecionada para ajuste da equação polinomial. Verificou-se que, tanto para o íon cloreto como para o íon sulfato, para a faixa de frequências entre 200 e 600 kHz, a maior relação sinal/ruído (RSR) foi obtida em 550 kHz, para a qual se encontrou a resposta máxima do detector, nas condições do experimento.



**Figura 9.** Eletroferograma da separação de íons cloreto e sulfato indicando a extensão das regiões adjacentes aos picos selecionadas para cálculo do ruído e as respectivas regressões polinomiais

### Repetibilidade

Para avaliar a resposta do detector quanto ao desvio padrão dos valores do tempo de migração, realizaram-se 4 réplicas em solução aquosa contendo os cátions potássio e sódio, cujo comportamento na separação eletroforética é conhecido da literatura<sup>25,33</sup>. A Figura 10 mostra a sobreposição dos eletroferogramas para estes cátions empregando como eletrólito de corrida uma mistura de MES e His, ambos na concentração  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , em fluxo normal. Os coeficientes de variação calculados a partir dos dados destes eletroferogramas (Tabela 1) apresentam valores em torno de 0,5% para os tempos de migração e de 50% para as áreas dos picos. Os resultados indicam que a repetibilidade do processo de separação é superior àquela do volume de injeção das amostras. No laboratório encontram-se em andamento estudos para aprimorar o sistema mecânico de injeção.



**Figura 10.** Sobreposição de 4 eletroferogramas obtidos com uma solução  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  em íons sódio e potássio, em fluxo normal, no eletrólito MES e His, ambos na concentração  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Voltagem de  $15 \text{ kV}$  e frequência de  $550 \text{ kHz}$

**Tabela 1.** Valores médios do tempo de migração e da área de pico e respectivos desvios padrão para os cátions potássio e sódio (fluxo normal) em eletrólito contendo MES e His, ambos na concentração  $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

parâmetros	potássio	sódio
tempo de migração ( $t_m$ ) médio (s)	175,3	219,8
desvio padrão do $t_m$ médio (s)	$\pm 0,5$	$\pm 0,3$
média da área de pico (Vs)	0,08	0,05
desvio padrão da área média (Vs)	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$

Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura<sup>25,33</sup>, ou seja, há uma boa definição e resolução dos cátions, indicando o desempenho adequado do equipamento e do detector construídos em laboratório.

### CONCLUSÕES

Foi construído um equipamento de análise por eletroforese capilar com detector oscilométrico provido de sistemas automáticos de injeção da amostra e de controle de temperatura do capilar. A aquisição do sinal do detector empregando um potenciostato permitiu o tratamento dos dados através do programa próprio deste equipamento.

Na separação de cátions e de ânions em misturas, o equipamento de eletroforese capilar reproduziu os resultados conhecidos da literatura, apresentando repetibilidade nos tempos de migração e boa resolução dos picos nos eletroferogramas. Para a faixa de valores de frequência investigada e nas condições do experimento, o maior valor da relação sinal/ruído foi obtido na frequência de máxima resposta do detector.

## AGRADECIMENTOS

À Capes/Fapergs/Finep-CTpetro.

## REFERÊNCIAS

1. Voegel, P. D.; Baldwin, P. R.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2267.
2. Vogel, A.; Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M.; *Análise Química Quantitativa*, LTC Ed. Rio de Janeiro, 2002, p. 134.
3. Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 173.
4. Jager, A. V.; Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 363.
5. Milazzo, G.; *Electrochemistry*, Elsevier Publishing Company: New York, 1963, p. 362.
6. Robinson, R. A.; Stokes, R. H.; *Electrolyte Solutions*, Butterworths: Londres, 1970, p. 87.
7. Bier, M.; *Electrophoresis Theory, Methods, and Applications*, Academic Press Inc: New York, 1959, p. 225.
8. Weinberger, R.; *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press: California, 2000, p. 11.
9. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298.
10. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111.
11. Huggins, T. G.; Henion, J. D.; *Electrophoresis* **1993**, *14*, 531.
12. Wallingford, R. A.; Ewing, A. G.; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1762.
13. Bastemeijer, J.; Lubking, W.; Laugere, F.; Vellekoop, M.; *Sens. Actuators, B* **2002**, *83*, 98.
14. Kappes, T.; Benedikt, G.; Schwarz, M. A.; Hauser, P. C.; *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 133.
15. Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 493.
16. Bockris, J. O'M.; Reddy, A. K. N.; *Modern Electrochemistry*, Plenum Press: New York, 1970, vol. 2, p. 831.
17. Polesello, S.; Valsecchi, S. M.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *834*, 103.
18. Hilmi, A.; Luong, J. H. T.; Nguyen, A. L.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *761*, 259.
19. Jensen, F. W.; Parrack, A. L.; *J. Ind. Eng. Chem.* **1946**, *10*, 595.
20. Vacík, J.; Zuska, J.; Muselasová, I.; *J. Chromatogr.* **1985**, *320*, 233.
21. Mász, M.; Bodor, R.; Kaniánsky, D.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *834*, 179.
22. Kaniánsky, D.; Zelenská, V.; Mász, M.; Iványi, F.; Gazdíkóvá, S.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *844*, 349.
23. Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4339.
24. Tuma, P.; Opekar, F.; Stulik, K.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3718.
25. Kubán, P.; Karlberg, B.; Kubán, P.; Kubán, V.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *964*, 227.
26. Kuban, P.; Kuban, P.; Kuban, V.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3725.
27. Lichtenberg, J.; de Rooij, N. F.; Verpoorte, E.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3769.
28. Tanyanyiwa, J.; Leuthardt, S.; Hauser, P. C.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *978*, 205.
29. Katzmayer, M. U.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W. J.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *850*, 355.
30. Altria, K. D.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 443.
31. da Silva, J. A.F.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 56.
32. Harrold, M.; Stillian, L. Bao; Rocklin, R.; Avdalovic, N.; *J. Chromatogr., A* **1995**, *717*, 371.
33. Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 563.