

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

OSMAR ANTUNES JUNIOR

**Novos Dispositivos de Microextração e
Pré-Concentração para Eletroforese Capilar
Utilizando Membranas Microporosas ou
Processos Eletroquímicos e sua Potencialidade
na Análise de Aminas e Metais**

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 10/07/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

OSMAR ANTUNES JUNIOR

**Novos Dispositivos de Microextração e
Pré-Concentração para Eletroforese Capilar
Utilizando Membranas Microporosas ou
Processos Eletroquímicos e sua Potencialidade
na Análise de Aminas e Metais**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química.*

*Área de Concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz*

São Paulo
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Antunes Junior, Osmar

A636n Novos dispositivos de microextração e pré-concentração para eletroforese capilar utilizando membranas microporosas ou processos eletroquímicos e sua potencialidade na análise de amins e metais / Osmar Antunes Junior. -- São Paulo, 2008. 130p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Gutz, Ivano Gebhardt Rolf

1. Instrumentação : Química analítica 2. Eletroforese capilar : Química analítica 3. Métodos eletroanalíticos : Química analítica
I. T. II. Gutz, Ivano Gebhardt Rolf, orientador.

543.07 CDD

*“Ainda que eu tivesse o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, (...) se não tivesse o amor, eu não seria nada. (...) O amor jamais passará.”
(1ª Epístola aos Coríntios 13, 2abd.8a).*

Ao Amor, dedico:

***Ao Amor Infinito e Onipotente,
minha fortaleza e meu refúgio, que sempre me
deu forças para superar as dificuldades.***

***Ao Amor Materno e ao Amor Paterno,
que sempre souberam nutrir e educar, corrigir e
apoiar, mostrando que sacrifício e amor não têm
limites.***

***Ao Amor Verdadeiro, que sempre
me apoiou, compreensivo e companheiro,
minha serenidade nas horas de desespero e
minha felicidade em todos os instantes de
minha vida.***

***Ao Amor de Mestre, que, sempre
paciente, soube ouvir e animar, guiar e dar
alento, partilhando seu tempo, saber e
experiência.***

***Ao Amor Fraternal, que conheci
através de meus amigos, sempre solidários
nas angústias, alegres na diversão, presentes
nos risos e nos choros.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por todas as graças com as quais me cumulou com Sua infinita bondade e que me permitiram chegar aqui, sempre desviando Seu olhar de minhas faltas.

Aos meus pais, Olinda e Osmar, por todos os ensinamentos, todo o amor, pelos inúmeros sacrifícios e exemplos, ao longo de toda minha vida que me fizeram tornar-me quem eu sou. A eles gratidão eterna.

À minha amada, Daniela, por trazer alegria e felicidade à minha vida de uma forma muito especial, por todo amor e companheirismo partilhado nos passos que até aqui demos juntos e por me fazer querer continuar nesta caminhada sempre ao seu lado. Te amo.

Ao professor Ivano G. R. Gutz, por toda paciência, retidão e amizade, em sua condução quase paternal durante este longo período de orientação. E pela ínfima parcela de seu conhecimento que pude apreender, do muito que me pôs a disposição.

Aos professores Claudimir e Lúcio, pelos ensinamentos partilhados, apoio científico e pelos longos colóquios, por vezes nada científicos.

A todos os colegas do laboratório, aos que nele se encontram e outros tantos que por ele passaram, pelo ótimo ambiente de trabalho, pelo auxílio e discussões científicas e filosóficas, pelos inúmeros momentos de descontração e pela amizade.

Ao Habbib, inestimável irmão que nunca tive. Por sua amizade solícita e sempre sincera, por todos os momentos de descontração e desespero que partilhamos e pelo muito que pude aprender de sua cultura e inteligência agudas e companhia inigualável. Por todos os comentários sarcásticos, por seu realismo contundente e por saber ser tão amável mesmo que tenhamos tudo para odiá-lo. És mui amado, mas, ainda assim, desprezível!

À Lúcia, pelos incontáveis anos de amizade, solidariedade, confissões, lágrimas, risos, brigas, soquinhos no baço, conversas, e tudo mais que esta longa caminhada nos ofereceu. Por ainda conseguir suportar minha presença depois de todo esse tempo. Pelo privilégio e sinceridade de sua amizade, agradeço.

Ao Volnir, pela amizade sempre presente, pelos risos e longas conversas sobre absolutamente nada de útil e pela inestimável companhia. Como se isso apenas não bastasse, pelos inúmeros reagentes, vidrarias e tudo mais que me forneceu e por todo tempo que dedicou a me ajudar, sempre que precisei.

Ao Thiago, pela amizade sempre constante, nas cervejas, nas pizzas, nos trabalhos da madrugada, nas conversas e nos cafés. Por todos cigarros que fumamos, por toda simplicidade e honestidade de coração, grato pela sua amizade!

À Maria, por toda honestidade única e amizade única desta criança. Pelas inúmeras conversas que travamos, por todo apoio que trocamos (se bem confesso que mais recebi), pelas vezes que choramos (se bem que mais ela chorou) e pelas vezes que rimos (com ou de alguém...). Por ainda me suportar depois de tantas mazelas, obrigado amiga.

Aos Moitas e aos Desprezíveis, por toda amizade, companheirismo, carteados e comilanças, risos e lágrimas, que me deram fôlego nesta jornada e me permitiram conhecer o significado da palavra irmão.

A Lianel, Aramil, Moradan, Miranda, Groo e Otto, por todo apoio e amizade que deram a Celeb e por tantas vezes que o trouxeram à sanidade ao longo de suas aventuras através de Oerth.

Ao Beira, mestre eterno, que me trouxe e manteve nesse laboratório e que tanto me ensinou. Pela luz nos primeiros passos científicos, pelas beirutadas partilhadas e jamais esquecidas (como limpar o ferro de solda), pela herança maligna, pelas técnicas de soquinhos no baço e, principalmente, pela amizade e pelo companheirismo.

Ao Fernando, por todo auxílio e disponibilidade no laboratório, e por todo conhecimento em eletrônica sem o qual o sistema FIA-CE jamais teria sido montado.

Aos inúmeros colegas, professores e funcionários do IQ por tudo que pude com eles aprender, pelo auxílio (da amizade, do apoio e dos galhos quebrados, às elucidações científicas e vidrarias e reagentes cedidos) e por tornarem mais fácil e agradável minha permanência neste local.

A Ivani Batista, pela colaboração no trabalho de determinação de DMAE, pelos cremes e por todo esforço em conjunto.

À CAPES pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

***“Festina Lente.”
(Apressa-te devagar!)
Caius Augustus***

***“Vaidade das
vaidades, diz o Eclesiastes,
vaidade das vaidades! Tudo é
vaidade!”
Livro do Eclesiastes 1,2***

***“Há uma peste no
homem, é a pretensão de saber
alguma coisa.”
Montaigne – Ensaaios, 1580.***

***“If you can meet
with Triumph and Disaster
And treat those
two impostors just the same”
Rudyard Kipling - If***

RESUMO

Antunes Junior, O. **Novos Dispositivos de Extração e Pré-Concentração para Eletroforese Capilar Utilizando Membranas Microporosas ou Processos Eletroquímicos e sua Potencialidade na Análise de Aminas e Metais**. 2008. 130p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química (Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação eficiente, que tem merecido grande atenção nas últimas duas décadas, e que oferece soluções analíticas alternativas ou complementares à cromatografia líquida num número crescente campos de aplicação, incluindo análises de fármacos, compostos biológicos e biogênicos, dentre outros. Entre as vantagens comparativas da técnica figuram separações mais rápidas com pequeno dispêndio de amostras, solução tampão (e solvente orgânico, se usado), baixo custo de operação e manutenção. Todavia, a exigüidade de amostra no capilar tem como reflexo, via de regra, limites de detecção menos favoráveis que os da HPLC, uma limitação significativa na análise de traços, suplantável por técnicas e procedimentos de extração/acumulação prévia dos analitos.

Nesta tese concebeu-se e implementou-se a combinação inédita entre a CE e a pré-concentração eletroquímica de metais. Novos dispositivos para extração líquido/gás/líquido mediada por membranas microporosas também foram propostos e aplicados à análise de aminas voláteis, sempre utilizando detector de condutância medida sem contato direto com a solução (C4D, *contactless capacitively coupled conductivity detection*). Primeiramente, sem recorrer à preconcentração, definiu-se condições de análise para 16 aminas (metilamina, dimetilamina, trimetilamina, propilamina, n-butilamina, s-butilamina, t-butilamina, hexilamina, DMAE, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano, 1,5-diaminopentano e 1,6-diaminohexano) juntamente com íon amônio, e, para análise de 9 metais (Ti^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+}

e Ni^{2+}). Um método completo para análise de dimetilaminoetanol em formulações cosméticas por CE-C4D foi desenvolvido e validado.

Os estudos de extração e pré-concentração líquido/gás/líquido foram realizados utilizando filamento oco de Oxyphan preenchido com solução coletora. Foi construída cela para extração gasosa constituída de recipiente fechado no qual se introduz amostra com analitos voláteis, ou volatilizáveis pela adição de reagente e/ou aquecimento (pervaporação). A bobina coletora de filamento oco preenchido com solução coletora foi montada na parte interna da tampa da cela. Testes realizados com amostras de tecidos de peixe demonstraram o funcionamento do sistema, que poderá ser aperfeiçoado e aplicado, por exemplo, à análise de aminas biogênicas primárias de baixo peso molecular, indicadoras de decomposição de certos alimentos.

Criou-se também extrator microvolumétrico em que o filamento de Oxyphan é montado concentricamente no interior de um capilar de sílica fundida, para realização de estudos de extração líquido/gás/líquido em fluxo. Um sistema em fluxo compreendendo válvulas e microbombas foi montado e colocado sob controle de um programa de computador (Labview), que, entre outras funções, controla o deslocamento da solução coletora exposta no filamento oco (13 μL) até o ponto exato da interface em que se dá a injeção no capilar da CE.

Pela primeira vez recorreu-se à acumulação eletroquímica (ECPC) de analitos num sistema FIA-CE-C4D – uma configuração baseada inteiramente na eletroquímica –, visando expandir os limites de detecção das determinações e eliminar interferência de matriz por troca de meio. Implementou-se a pré-concentração catódica seguida de redissolução anódica com uma célula eletroquímica especial, em que o capilar da eletroforese é posicionado junto ao eletrodo de trabalho, feito de ouro obtido a partir de CD's graváveis.

Uma célula microfluídica ECPC-FIA-CE-C4D também foi construída. Tomando íons Cu^{2+} como sistema modelo, demonstrou-se o aumento do sinal referente aos íons cobre(II) no eletroferograma para tempos crescentes de acumulação eletroquímica. Para a solução de alto teor salino contendo mistura dos íons Cd(II) , Pb(II) , Zn(II) e Cu(II) , comprovou-se a eliminação da interferência da matriz por troca de meio antes da redissolução anódica. Os testes iniciais indicam que os novos dispositivos e sistemas propostos nesta tese para uso em conjunto com a CE têm potencialidade para desencadear novas pesquisas, desenvolvimento de métodos e aplicações, sendo passíveis também de miniaturização e automação.

Palavras-chave: Eletroforese Capilar de Zona; Extração Gás-Líquido; Extração Líquido-Líquido; Voltametria de Redissolução Anódica; Aminas Biogênicas; Análise de Metais.

ABSTRACT

Antunes Junior, O. **New Devices for Extraction and Preconcentration with Microporous Membranes and Electrochemical Procedures prior to Capillary Electrophoresis and their Potential for the Analysis of Amines and Metals.** 2008. 130p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry (Analytical Chemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Capillary electrophoresis (CE) is an efficient separation technique that evolved rapidly in the last couple of decades, now offering complementary or alternative analytical solutions to liquid chromatography for an expanding number of application fields including drugs, biological and biogenic compounds. Some comparative advantages of CE are faster separation, very low consumption of buffer solutions and samples (and organic solvents, if any), lower maintenance and operational costs. However, the quantification of a few nanoliters of analyte in a capillary, as a rule, compromises the detection limits attainable by HPLC, a shortcoming in trace analysis, supplantable by extraction/preconcentration of the analytes from the sample.

The combination of electrochemical preconcentration (ECPC) with CE is first proposed in this thesis and tested with metal ions. New devices for liquid/gas/liquid extraction based on microporous filaments filled with a collector solution were proposed and applied to the analysis of volatile amines, The detector of choice was the C4D (capacitively coupled contactless conductivity detection) and CE-C4D working conditions were defined for the separation and determination of: i) 16 amines (methylamine, dimethylamine, trimethylamine, propylamine, n-butylamine, s-butylamine, t-butylamine, hexilamine, ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, DMAE, 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane, 1,5-diaminopentane and 1,6-diaminohexane) plus ammonium, ii) nine metallic ions (Ti^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+}). A complete method of

analysis for Dimethyl-amino-ethanol (DMAE) in cosmetic formulations was established and validated.

Liquid/gas/liquid extraction studies were based on the use of a polypropylene microporous filament (Oxyphan[®]) filled with the collection solution. A closed cell was devised in which an Oxyphan[®] coil is installed beneath the cap and volatilization of sample components can be promoted by heating (pervaporation) or addition of a reactant. The device was successfully tested with fish samples by the detection of primary low molecular weight biogenic amines, a procedure of special interest in fast checking of fish or other foods for decomposition.

A microvolumetric version of the liquid/gas/liquid extractor was created with an Oxyphan[®] hollow fiber mounted concentrically inside a silica capillary. A flow system comprising the micropumps, solenoid valves and the microextractor was designed, automatically operated under software control (Labview). This FIA-CE system was tested by the extraction/enrichment of volatile amines in the collecting solution (13 μ L) followed by accurate displacement to the interface with the CE capillary by the micropumps.

Pioneering work with ECPC-FIA-CE-C4D – an all-electrochemical system – was conducted in this thesis aiming expanded detection limits and matrix effect reduction. An electrochemical cell for the interface with FIA-CE system was built in acrylic using gold electrodes made from gold-sputtered CD-Rs. A microfluidic version of the cell interfaced with the CE capillary was also conceived. The full system was evaluated by using Cu^{2+} as a model specie; an increase in analytical signal was observed as a function of the cathodic deposition time before stripping. For a mixture of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} in a high saline media, elimination of the matrix interference by medium exchange before stripping was demonstrated. Initial favorable evaluations show that the devices and systems proposed in

the thesis have the potential to engender further research of methods and applications as well as miniaturization and automation of procedures.

Keywords: Zone Capillary Electrophoresis, Gas-Liquid Extraction, Liquid-Liquid Extraction, Anodic Stripping Voltametry, Biogenic Amines, Metal Analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

C4D – Detecção Condutométrica sem Contato (*Capacitively Coupled Conductometric Contactless Detection*)

FIA – Análise por Injeção em Fluxo (*Flow Injection Analysis*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

MS – Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

ECPC – Pré-Concentração Eletroquímica (*Electrochemical Preconcentration*)

DMAE – Dimetilaminoetanol

LLE – Extração Líquido-Líquido (*Liquid-liquid Extraction*)

LLME – Microextração Líquido-Líquido (*Liquid-liquid Microextraction*)

GLE – Extração Gás-Líquido (*Gas-liquid Extraction*)

GLME – Microextração Gás-Líquido (*Gas-liquid Microextraction*)

SLM – Membrana Líquida Suportada (*Supported Liquid Membrane*)

HFME – Microextração com Filamento Oco (*Hollow Fiber Microextraction*)

Aminas: 1,3-DAP – 1,3-Diaminopropano; **1,4-DAB** – 1,4-Diaminobutano (putrescina);

1,5-DAP – 1,5-Diaminopentano (cadaverina); **1,6-DAH** – 1,6-Diaminohexano; **MMA** –

Metilamina; **DMA** – Dimetilamina; **TMA** – Trimetilamina; **MEA** – Etilamina; **DEA** –

Dietilamina; **TEA** – Trietilamina; **PA** – Propilamina; **NBA** – n-Butilamina; **SBA** – sec-

Butilamina; **TBA** – terc-Butilamina; **HA** – Hexilamina; **EtoIA** – Etanolamina; **diEtoIA** –

Dietanolamina; **triEtoIA** – Trietanolamina.

SUMÁRIO

<i>1- Introdução</i>	18
1.1 – Das técnicas utilizadas.....	19
1.1.1 - Eletroforese capilar (CE)	19
1.1.2 - Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	22
1.1.3 - O acoplamento FIA-CE	24
1.2 - Pré-concentração e tratamento de amostras	26
1.2.1 - Extração líquido-líquido	27
1.2.2 - Extração gás-líquido	32
1.2.3 – Microextrações líquido-líquido e gás-líquido acopladas a CE	32
1.3 - Tratamento eletroquímico	33
1.3.1 – Pré-concentração eletroquímica acoplada a CE.....	34
<i>2- Objetivos</i>	37
<i>3- Materiais e Métodos</i>	39
3.1 – Reagentes.....	39
3.2 – Equipamentos	40
<i>4-Resultados e Discussão</i>	42
4.1 - Utilização do C4D em FIA	42
4.1.1 – Resultados.....	44
4.2 – Determinação de aminas	47
4.2.1 – Determinação de aminas por CE-C4D	48

4.2.2 – Desenvolvimento de metodologia para determinação de DMAE em formulações cosméticas.....	54
4.2.2.1 – Determinação de DMAE por CE-C4D.....	55
4.2.2.2 – Determinação de DMAE por Espectrofotometria UV-Vis.....	59
4.3 – Extração gás-líquido com membrana microporosa	64
4.3.1 – Construção de dispositivo para extração gás-líquido	66
4.3.2 – Avaliação do dispositivo proposto.....	71
4.3.3 – Determinação de aminas voláteis com cela de extração gasosa e CE-C4D.....	75
4.3.4 – Extração Espécie Voláteis em Peixes Utilizando Cela de Extração Gás-Líquido.....	79
4.3.5 – Construção da Célula Microvolumétrica de Extração Líquido-Líquido	82
4.3.6 – Sistema HFME-FIA-CE-C4D	83
4.4 – Pré-concentração eletroquímica de íons metálicos e determinação por CE-C4D	93
4.4.1 – Determinação de cátions metálicos em CE-C4D.....	93
4.4.2 – Comportamento eletroquímico e pré-concentração de alguns cátions metálicos	97
4.4.3 – Construção de Célula para ECPC em fluxo acoplada a CE-C4D ...	101
4.4.4 – Ensaios iniciais de ECPC-FIA acoplada a CE-C4D para alguns cátions metálicos.....	109
4.4.5 – ECPC-FIA-CE-C4D	112
5- Conclusões e Perspectivas	120

6- Referências	123
----------------------	-----

1

Introdução

1- Introdução

A combinação da análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*, FIA) com a eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) é um campo recente, que vem encontrando rápida expansão, estendendo-se desde a justaposição de equipamentos (total ou parcialmente) comerciais ao verdadeiro interfaceamento direto entre as duas técnicas. Tipicamente, aparelhos comerciais utilizam detectores espectrofotométricos na região do ultravioleta e visível (UV-vis) e efetuam a transferência da amostra do circuito FIA para o capilar da CE por via eletrocinética.

Simonet [1] já indica os limites de detecção mais elevados que os da HPLC como uma das limitações da CE, devido à pequena quantidade de amostra introduzida, principalmente, quando associada a detectores mais acessíveis e não-específicos, como os fotométricos, apontando as principais tendências para aumento de sensibilidade da técnica, como exemplificado na figura 1. O acoplamento FIA-CE permite associar à CE a grande flexibilidade dos sistemas FIA, que consiste na facilidade de acoplar uma série de métodos de pré-tratamento e pré-concentração das amostras antes de sua introdução na eletroforese. Neste contexto, escolheu-se estudar as microextrações líquido-líquido e gás-líquido, capazes de efetuar a extração do analito de interesse de amostras mais complexas e pré-concentrar elevada quantidade de amostra em volumes da ordem de μL , suficientes para a injeção em CE, além de permitir amostragem acumulativa, como no caso, principalmente da extração gás-líquido. Também merecem destaque as técnicas de pré-concentração eletroquímicas,

aplicáveis principalmente a íons metálicos, que pode ser de grande interesse em análises ambientais.

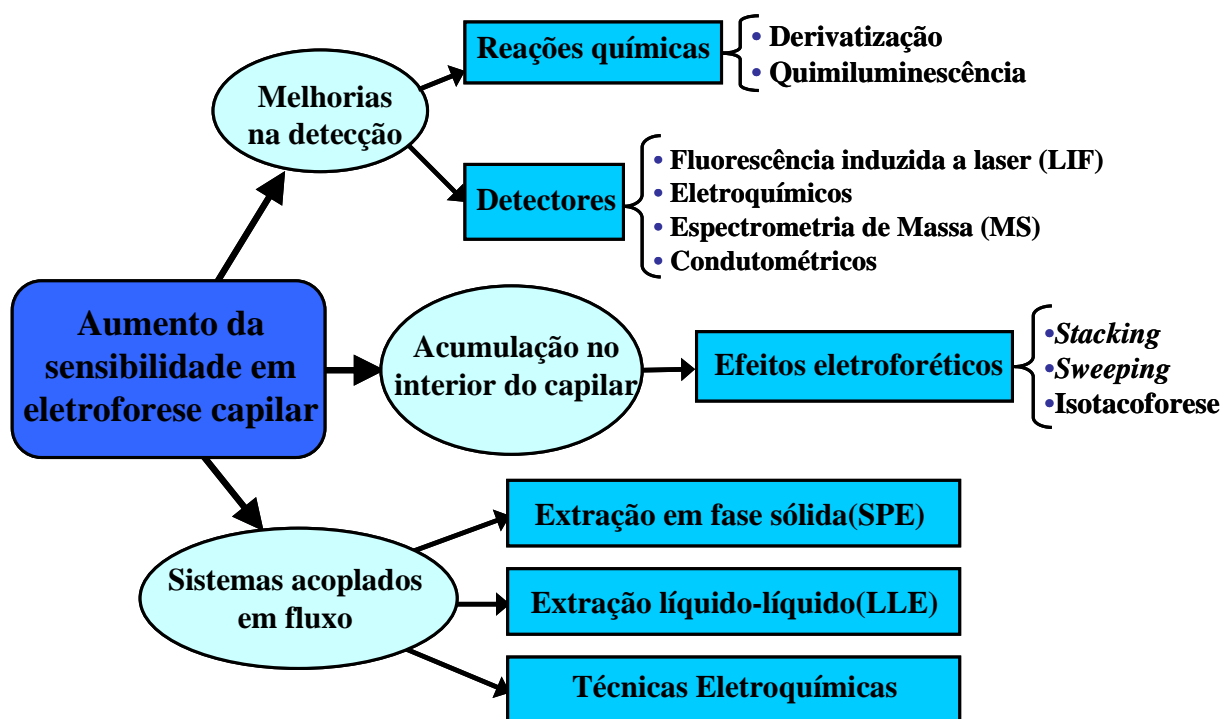


Figura 1- Estratégias para aumentar a sensibilidade nas determinações por eletroforese capilar. (adaptado de Simonet, B. M., Rios, A., Valcarcel, M., *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22, 605-614.)

1.1 – Das técnicas utilizadas

1.1.1 - Eletroforese capilar (CE)

O desenvolvimento pioneiro da eletroforese é comumente atribuído a Tiselius, por volta dos primeiros anos da década de 30, por ter introduzido o método de fronteira móvel para a separação de algumas proteínas presentes no soro sanguíneo, mas foi a

partir dos anos 80, com a implementação das técnicas capilares, que a eletroforese passou a integrar com maior frequência os laboratórios de pesquisa e análises de rotina, sob a égide de eletroforese capilar de zona [2]. Deve-se destacar, contudo, que outras modalidades de eletroforese, principalmente a eletroforese em gel, encontram ainda larga utilização, sobretudo em laboratórios de pesquisa bioquímica na separação de biomoléculas de elevado peso molecular.

O material mais frequentemente utilizado na confecção dos capilares para CE é a sílica fundida, sendo preferidos os capilares com diâmetro interno da ordem de algumas dezenas de μm (usualmente entre 25-75 μm), por apresentarem características bastante interessantes como elevada condutividade térmica, boa resistência mecânica, resistência a ataques químicos, elevada transmitância óptica e a possibilidade de se induzir fluxo eletroosmótico quando um campo elétrico é aplicado. O exterior do capilar de sílica é revestido por uma camada de poliimida, principalmente para conferir proteção mecânica ao mesmo (normalmente quebradiço devido à sua elevada dureza) garantindo-lhe certa flexibilidade.

As paredes do capilar de sílica possuem grupos silanóis que podem ser facilmente desprotonados em meio aquoso mediante ajuste do pH. Como consequência da formação de uma superfície com carga negativa, cátions hidratados tendem a se aproximar da superfície do capilar, gerando uma distribuição destes de acordo com um gradiente de concentração, ao longo da dupla camada elétrica, que decresce com a distância, até que sua concentração seja igual à do âmago da solução[2]. Ao se aplicar um campo elétrico, os cátions tendem a se deslocar no sentido do eletrodo negativamente carregado, definindo um plano de cisalhamento rente às paredes do

capilar, e gerando o fluxo eletroosmótico, que arrasta toda a solução rumo ao pólo negativo. Diferentemente do perfil de velocidades parabólico assumido por uma solução ao fluir no interior de um tubo como, por exemplo, na análise por injeção em fluxo, gerando dispersão da amostra, na CE as velocidades são iguais ao longo de toda seção transversal, de modo que a movimentação da solução pelo fluxo eletroosmótico não gera semelhante dispersão.

Sob a aplicação de um campo elétrico, espécies carregadas tendem a apresentar sua própria migração em função de seus coeficientes de mobilidade iônica. Dessa forma, sobrepondo-se ao fluxo eletroosmótico, a diferente mobilidade de cada íon resulta na separação de misturas de diferentes espécies, possibilitando detecção diferenciada ao passarem pelo detector. Estas características conferem à eletroforese um elevado poder de separação, que também é dependente, dentre outros fatores, do comprimento do capilar utilizado, da alta tensão aplicada, da quantidade de amostra introduzida e do tampão de corrida utilizado [2].

Devido às dimensões internas micrométricas do capilar de sílica fundida, os volumes utilizados na transferência de amostra para análise, são diminutos (da ordem de dezenas de nanolitros). Entretanto, se o consumo de material é drasticamente reduzido, via de regra, esta pequena quantidade de amostra é responsável pela deficiente sensibilidade da CE quando se associam os mesmos detectores empregados em HPLC. O detector mais consagrado, baseado em espectrofotometria na região do UV ou visível, tem sua sensibilidade prejudicada pelo reduzido caminho óptico oferecido pelo capilar (salvo quando se recorre a células em forma de Z), freqüentemente agravada pela necessidade de recorrer à detecção indireta. Detectores eletroquímicos

em geral, incluindo os baseados em condutividade, tal como o utilizado neste trabalho, apresentam as mesmas limitações de sensibilidade. Assim, a CE apesar da superior capacidade de separação, não consegue competir com a HPLC na análise de traços de componentes de interesse numa variedade de amostras reais complexas, por exemplo, espécies tóxicas, mutagênicas ou drogas controladas em águas, alimentos ou fluidos biológicos, salvo com detectores muito sofisticados ou caros (p.ex., fluorescência induzida por laser ou espectrômetro de massa) ou caso se proceda à pré-concentração dos analitos, existindo vasta literatura e artigos de revisão sobre este campo[3-5].

1.1.2 - Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo pode ser basicamente definida como um sistema de análises dinâmico, em que se efetua a introdução de um volume de amostra dentro de um percurso específico pelo qual passa um fluxo de solução transportadora. Este fluxo é impulsionado por uma força motriz (bomba peristáltica ou de pistão, diferença de pressão, gravidade, etc.) em direção a um detector, capaz de registrar o sinal transiente, em geral em forma de um “pico”, cuja altura (ou área) guarda relação com a concentração do analito. Esta aproximação confere extraordinária flexibilidade à implementação e combinação de procedimentos analíticos simples ou complexos como, por exemplo, adição de reagentes e solventes, extrações e separações, resultando em rapidez e reprodutibilidade muito superiores às geralmente conseguidas em procedimentos manuais[6]. Devido a estas e inúmeras outras vantagens, incluindo

facilidade de automação, aumento da frequência analítica, possibilidade de economia de reagentes e diminuição dos riscos de contaminação (seja do ambiente, seja da amostra), o número de publicações envolvendo procedimentos FIA segue crescendo tanto na literatura nacional quanto internacional[7, 8].

Em anos recentes, vem sendo pesquisada a miniaturização dos dispositivos utilizados, visando, em última instância, chegar às dimensões de um "chip"[9, 10], preferencialmente, por técnicas de produção em massa.

Outra vertente é a inclusão de etapas de digestão/solubilização de amostras em fluxo, com substituição do aquecimento convencional da amostra e reagentes por irradiação com microondas[11, 12], ultrassom[13] ou UV[14]. Nessa última modalidade, doutorando anterior do orientador desta tese criou um inovador sistema em fluxo em que a aceleração da digestão de matéria orgânica nas amostras por UV é realizada por adição de um fotocatalisador, o TiO_2 (anatase em suspensão), e que abrange as etapas de adição de amostra, TiO_2 , oxigênio, irradiação, remoção de bolhas, retirada de oxigênio, acumulação em gota de Hg, troca de eletrólito e determinação por voltametria de redissolução anódica[15].

Apesar de na prática a FIA compartilhar dispositivos similares ou equivalentes aos da cromatografia líquida, como bombas, injetores e colunas, a separação dos componentes de misturas complexas não é abrangida na análise em fluxo, tratando-se de domínio da cromatografia e da eletroforese. Na CE, o "bombeamento" da solução como um todo é obtido eletroquimicamente, através do fluxo eletrosmótico, sendo que a separação dos componentes também é eletroquímica, pois se baseia na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis sob o efeito de um campo elétrico,

podendo ser classificada como uma técnica de separação não-cromatográfica (salvo na cromatografia eletrocinética micelar, *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC, e na eletrocromatografia capilar). Naturalmente, em todas elas, também o detector pode ser eletroquímico, p.ex., condutométrico – universal e aplicado tanto na CE como em FIA ou HPLC (cromatografia de íons).

1.1.3 - O acoplamento FIA-CE

A união entre as técnicas FIA e CE surge como um acoplamento bastante promissor, por reunir a excelente capacidade de separação da eletrofoese com a facilidade de automação de procedimentos analíticos envolvendo a amostra em fluxo[16-18], tais como pré-concentração, diluição, extração, transferência de fases, condicionamento do meio para análise e/ou derivatização, entre outros, servindo como exemplo a diálise *in vivo* para monitoramento da ação de fármacos em ratos[19], a pré-concentração de metais em coluna C18[20] ou de troca iônica[21], monitoramento de dissolução de medicamentos[22] e a separação de espécies voláteis com unidade de difusão gasosa[23].

Em dissertação de mestrado defendida no IQ-USP em 2002[24], foi demonstrada a possibilidade de construir no laboratório, com componentes relativamente simples e acessíveis, sistema em fluxo em que se alia a versatilidade da FIA com o poder de separação da CE. A sinergia FIA-CE ainda não foi amplamente investigada e explorada pois a maioria dos trabalhos sobre o assunto surgiram a partir da segunda metade da

década de 90, como se verifica em artigos de revisão[16-18]. O número de trabalhos com interfaces FIA-CE diretas é mais reduzido ainda, vez que em grande parte dos trabalhos classificados pelos autores como sendo de FIA-CE, instrumentos (total ou parcialmente) comerciais são justapostos e a transferência da amostra entre os sistemas se dá via coletor de frações ou injetor mecanizado do equipamento de eletroforese.

O protótipo desenvolvido neste Instituto[24] apresenta como aspectos atraentes, o injetor multicanal com válvulas de estrangulamento de dimensões reduzidas[25], a interface coaxial simples e efetiva para a transferência eletrocinética ou hidrodinâmica da amostra do circuito FIA para a coluna capilar em que se processa a separação eletroforética dos analitos, culminando com a detecção dos mesmos por condutometria sem contato (*capacitively coupled contactless conductivity detector*, C4D, desenvolvida por da Silva e do Lago[26-30],). Este protótipo é um dos poucos a possibilitar a transferência (ou injeção) hidrodinâmica (por diferença de pressão) na interface FIA-CE sendo que na literatura se observa preferência na transferência (injeção) eletrocinética, mais simples embora não universal, vez que favorece a introdução no capilar das espécies com maior mobilidade iônica.[18]

Cabe destacar que a transferência deve se dar de maneira bem sincronizada com o circuito FIA, via de regra, quando o ponto menos disperso da zona de amostra (mistura de analitos ou seus produtos) se encontra frente ao capilar. Em outras palavras, a transferência hidrodinâmica deve coincidir com o “pico” do sinal analítico transiente gerado no sistema FIA. No protótipo mencionado, o tempo exato foi determinado experimentalmente e mantido fixo no programa de controle executado pelo

microcomputador (também responsável pela aquisição de dados, etc.). Esta metodologia incorre, no entanto, em uma limitação, pois ao se desenvolver novos métodos, ou mesmo à medida que ocorre fadiga das mangueiras acionadas pela bomba peristáltica, o sincronismo necessita ser reajustado. Desta forma, torna-se conveniente a instalação de um segundo detector (por exemplo, também condutométrico sem contato) na entrada da interface FIA-CE, de modo a localizar o “pico” dinamicamente, possibilitando o desenvolvimento de um programa que cuidaria do sincronismo automático das transferências. Também seria mais fácil implementar procedimento para recorrer à diluição controlada (aproveitando o perfil de dispersão do circuito FIA) da amostra.

Entretanto, sempre que se desejar rumar na direção de analitos em concentrações muito baixas, haverá problemas com o limite de detecção da CE-C4D, via de regra na região de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ [26, 27] (sendo tanto menos favorável quanto maior a semelhança entre a mobilidade dos íons do tampão e do analito). Tem, pois, grande relevância, a investigação de métodos de pré-concentração para CE em geral e para FIA-CE-C4D em especial, vez que facilita a automação dos procedimentos envolvidos e possibilita ganho de sensibilidade.

1.2 - Pré-concentração e tratamento de amostras

Apesar do notável esforço e perceptível progresso no desenvolvimento de técnicas de análise química direta de sistemas materiais a caracterizar, via de regra, a quantificação só é possível após a aplicação de um ou mais procedimentos prévios.

Entre os motivos, figuram: a) técnicas restritas a amostras em fase líquida homogênea ou isenta de macromoléculas e partículas; b) técnicas que sofrem interferência de "matéria orgânica", eletrólito concentrado ou de outros componentes da matriz; c) analitos em concentrações inferiores às alcançáveis pela técnica; d) determinação indireta de analitos não detectáveis; e) especificação de várias formas de um elemento; f) número de constituintes ativos superior ao tratável pela técnica.

Métodos bastante utilizados no preparo e na pré-concentração de amostras são os processos de extração (p. ex. extração em fase sólida, extrações líquido-líquido e gás-líquido, envolvendo ou não fase orgânica ou fluido supercrítico). No campo da separação de analitos por extração, os sistemas em fluxo são muito atraentes por permitirem eliminar um amplo leque de procedimentos manuais, economia de reagentes, facilidade de automação e melhor reprodutibilidade no procedimento, sendo que o assunto mereceu detalhada revisão[31-33] bem como menção em livros especializados em análise em fluxo[9, 34]. Assim sendo, os métodos de extração líquido-líquido e gás-líquido receberão especial atenção neste levantamento, por se tratar dos principais métodos abordados nesta tese.

1.2.1 - Extração Líquido-Líquido

Há muito utilizada nos laboratório didáticos e científicos de forma rotineira, a extração líquido-líquido se vale, usualmente, da imiscibilidade de dois solventes e dos diferenciados coeficientes de partição dos analitos nos meios considerados, para

promover a separação das espécies. Na extração líquido-líquido em fluxo recorre-se, em geral, à alternância entre segmentos de fase orgânica e aquosa, com diversificados e engenhosos separadores de fase ao final do percurso, que nem sempre são fáceis de colocar em operação, sendo que uma alternativa à confecção e utilização dos mesmos passa a ser a recorrência a membranas que impeçam a mistura das fases aquosa e orgânica, permitindo, no entanto, a passagem do analito[31].

A utilização de membranas nos processos de extração gás-líquido e líquido-líquido tem merecido bastante interesse, pois podem incrementar seletividade ao sistema, reduzir o consumo de reagentes (solventes orgânicos) utilizados e dar versatilidade às montagens, permitindo seu fácil acoplamento em sistemas de extração em fluxo, substituindo vantajosamente os separadores de fase. Via de regra, as membranas funcionam como uma barreira seletiva entre duas fases, promovendo a separação do material entre os meios que isola, como indicado na figura 2. Há sempre uma força que promove a passagem do analito através da membrana, levando a cabo a separação. Usualmente, essa força motriz pode ter três origens: 1- gradiente de concentração (promovendo difusão e transporte de moléculas), 2- gradiente de potencial elétrico (resultando em migração e transporte de cargas) e 3- gradiente de pressão (levando a convecção forçada e ao transporte de volumes).

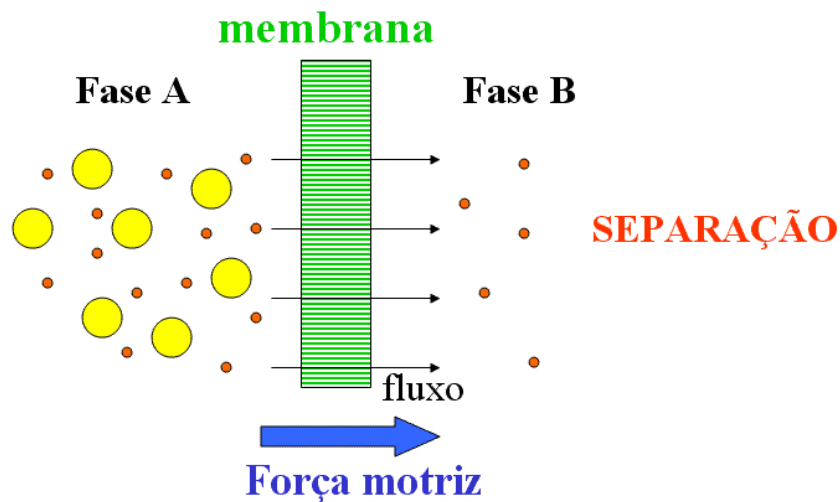


Figura 2 - Mecanismo de separação com membrana.

As membranas podem também ser divididas quanto ao seu tipo, sendo as mais usuais as **membranas porosas**, que permitem contato entre as fases, proporcionando seletividade limitada à exclusão de tamanho, ou, se hidrofóbicas, possibilitando somente a passagem de moléculas em estado gasoso entre duas fases aquosas, as **membranas de troca iônica**, que proporcionam seletividade por repulsão e exclusão de cargas além de exclusão de tamanho e as **membranas não-porosas**, que usualmente são polímeros ou filmes líquidos, cuja seletividade se dá com base em propriedades físico-químicas, como solubilidade, coeficiente de partição, entre outras.

Adicionalmente, uma membrana porosa hidrófoba pode ser utilizada para absorver e servir de suporte mecânico a um solvente orgânico, definindo um filme fino do mesmo, de modo que se possa fazer a extração da substância de interesse de uma fase aquosa através deste filme, para a fase orgânica ou, consecutivamente, para uma

segunda fase aquosa. Esta metodologia foi introduzida por Audusson[35] e demonstrada realizando a extração de amins (B) de uma fase aquosa doadora com pH elevado para uma fase aceptora com pH baixo, conforme ilustrado na figura 3. Após sofrer desprotonação em pH elevado, as amins solubilizadas no filme orgânico atravessam a membrana, sendo irreversivelmente acumuladas na fase aceptora de pH baixo, permitindo sua extração unidirecional e acumulação. As espécies carregadas, por não apresentarem afinidade com a fase orgânica não são extraídas e as espécies neutras não são acumuladas.

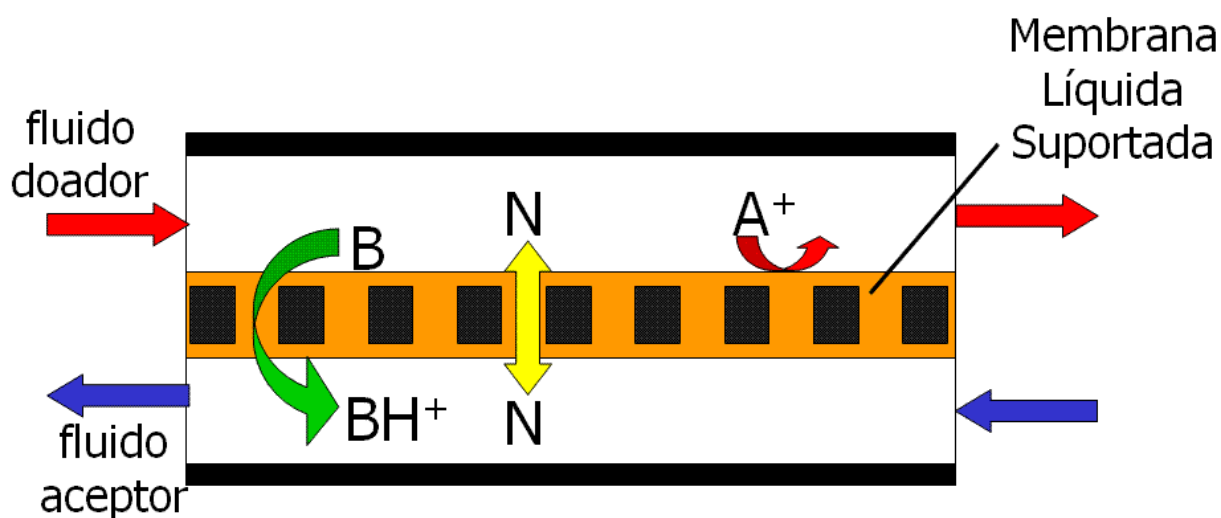


Figura 3 - Esquema de separação utilizando Membrana Líquida Suportada. Fluido doador: meio básico; fluido aceptor: meio ácido; B – espécie básica (p. ex. amins), N – espécies neutras e A – espécie cationica em meio básico.

Esta estratégia, permite minimizar o uso de solventes e acelerar o procedimento de extração, mediante a impregnação de membrana porosa com fase orgânica,

resultando a assim chamada membrana líquida suportada (*supported liquid membrane*, SLM). Estudos fundamentais e aplicações de SLMs têm merecido atenção na literatura e os artigos vem sendo sistematizados em revisões acerca de técnicas envolvendo métodos de extração e separação utilizando membranas[33, 36-38]. Tal como na clássica extração líquido-líquido, com SLMs pode-se extrair analitos de matrizes complexas com elevada seletividade e com pré-concentração. Estas características podem ser otimizadas explorando-se diversos aspectos como: i) pH das soluções aceptora e doadora, ii) solvente orgânico utilizado, iii) utilização de aditivos (complexantes, formadores de par iônico, para facilitar o transporte seletivo através da membrana) e de agentes seqüestrantes na fase aceptora, impedindo perda do analito. Obviamente a pré-concentração do analito deve se dar de maneira seletiva em relação aos interferentes que compõem a matriz da amostra.

Por ser a extração com SLM um campo relativamente recente, há grande descompasso entre o que já foi investigado e o que, potencialmente, poderá vir a ser adaptado ou melhorado da miríade de aplicações conhecidas de extração em fase líquida desenvolvidas em *batch* ou em fluxo[31]. Adicionalmente, as membranas planas – disponíveis há mais tempo – receberam maior atenção em extratores por SLM, enquanto que as membranas microporosas em forma tubular, com diâmetro sub-milimétrico, por vezes chamadas filamentos ocos, foram introduzidas no laboratório analítico há menos tempo e vêm se mostrando particularmente interessantes em aplicações que demandem reduzido volume de amostra. Por ser a escala das extrações conduzidas com estas membranas bastante reduzida, vem se consolidando a

designação de microextração, mais especificamente, microextração líquido-líquido (*liquid-liquid microextraction*, LLME).

1.2.2 - Extração gás-líquido

O problema do transporte de matéria através da membrana é, obviamente, menos acentuado quando se trabalha com meio menos viscoso, sendo particularmente favorável a fase gasosa, seja com fase líquida (hidrofílica, para membranas hidrófobas) de ambos os lados, seja com fluxo doador gasoso e receptor líquido. A exemplo disto, já têm sido utilizados tubos microporosos de Oxiphan® para promover a coleta acumulativa de espécies relevantes da atmosfera, como NH_3 , CH_2O e H_2O_2 [39-41]

1.2.3 – Microextrações líquido-líquido e gás-líquido acopladas a CE

As técnicas de microextração, seja LLME ou GLME, são particularmente compatíveis com a CE, pois, como os capilares utilizados nesta possuem diâmetro interno micrométrico, o volume de amostra a ser transferido a partir dos filamentos ociosos é muito pequeno, usualmente, alguns nanolitros ou menos.

Assim, provendo volumes reduzidos de fase receptora aquosa, mas com considerável pré-concentração dos analitos, a LLME abre atraentes perspectivas como etapa prévia da CE, tais como melhora no limite de detecção e introdução no capilar de

uma amostra mais limpa dos interferentes da matriz, resultando eletroferogramas mais simples[42-44]. Adicionalmente, não há incompatibilidade com procedimentos adicionais, praticáveis no próprio capilar usado na eletroforese, para incrementar a sensibilidade. Exemplo elegante (quando aplicável) é o assim chamado *stacking* (ou mesmo duplo *stacking* [42]), que permite a focalização do analito numa banda mais estreita do capilar que a região ocupada pela amostra introduzida, desde que a banda da amostra contenha menos eletrólito que o tampão selecionado.

1.3 - Tratamento eletroquímico

Além das microextrações mencionadas, há outras formas de efetuar pré-concentração e pré-tratamento de amostras e, entre elas, serão consideradas as baseadas em processos eletroquímicos. As formas mais freqüentes de pré-concentração eletroquímica, ECPC, consistem em técnicas completas, nas quais a acumulação é seguida de redissolução anódica, durante a qual, em geral (mas não necessariamente), se faz a determinação por voltametria (*anodic stripping voltammetry*, ASV) ou potenciometria sob corrente constante (*potentiometric stripping analysis*, PSA). Nestes processos, efetua-se, via de regra, a eletrodeposição seletiva dos íons metálicos de interesse sob condição potencioestática, reduzindo-os à sua forma metálica no eletrodo de trabalho, extraíndo-os da matriz em que se encontram, sob convecção forçada e durante período de tempo significativo. Formação de amálgama, acumulação de um adsorbato ou composto insolúvel no eletrodo são outras alternativas. Após esta

etapa de deposição pode-se, opcionalmente, substituir o eletrólito antes de efetuar a redissolução (oxidação) das espécies acumuladas.

Apesar de técnicas eletroanalíticas como a ASV e PSA, entre outras, permitirem a determinação seletiva e altamente sensível de significativo número de analitos acumulados, eventualmente, podem ocorrer sobreposição de sinais, dificuldade de determinar componentes menores na presença de altas concentrações de componentes eletroativos, corrente residual elevada ocasionada por descarga de hidrogênio ou redução de oxigênio, sobreposição de picos voltamétricos por formação de compostos intermetálicos, ou ainda, corrente capacitiva ou de formação de óxidos na superfície (particularmente relevante para eletrodos de área grande), ou mesmo perda de sinal por baixa reversibilidade ou envenenamento do eletrodo[45]. Nestes casos em que a determinação voltamétrica é desfavorável, a acumulação eletroquímica continua sendo valiosa como etapa prévia de técnicas de determinação muito seletivas como espectrofotometria de absorção atômica em chama[45] ou forno de grafite[45], espectrometria de massa[46] e cromatografia de íons[47].

1.3.1 – Pré-concentração eletroquímica acoplada a CE

A maioria dos artigos que utilizam ECPC combinada a outras técnicas de detecção enfoca íons metálicos variados, devido à grande compatibilidade de seus comportamentos eletroquímicos (usualmente reversíveis ou quase-reversíveis eletroquimicamente) com a técnica utilizada. Encontram-se também trabalhos que

envolvem a ECPC de compostos orgânicos, como o caso de Pretty et. al.[46], onde tamoxifen, uma droga anticancerígena, é acumulada sobre eletrodo de carbono vítreo, aplicando-se um potencial negativo, insuficiente para causar a redução do composto, mas adequada para promover sua adsorção. Na seqüência, efetua-se a lavagem da amostra (troca de matriz), sendo então aplicado um pulso de potencial para a liberação do analito para detecção com espectrometria de massa. Já como etapa de pré-concentração para CE, não se encontrou trabalhos na literatura, sendo que a utilização de métodos eletroquímicos se restringe à ação auxiliar na injeção de amostra no capilar para CE. Trata-se da injeção eletroquimicamente assistida, proposta por Matysik[48], que cita como vantagem a possibilidade da conversão de espécies neutras em espécies iônicas para possibilitar sua separação eletroforética, bem como estudo e acompanhamento de reações eletroquímicas.

É, portanto, inteiramente original a proposta desta tese, de combinar a ECPC com a CE. Acredita-se que, uma vez viabilizada tecnicamente, preferencialmente com interfaceamento direto de sistema ECPC-FIA com a eletroforese, serão desencadeadas amplas pesquisas visando estabelecer métodos analíticos mais sensíveis e/ou seletivos que os possíveis pela ASV ou PSA e pela CE isoladamente, sendo que a determinação de metais pesados tóxicos poderá ser o primeiro foco de interesse prático.

Cabe destacar que a proposta compreende um sistema integralmente eletroquímico, da pré-concentração à separação por eletromigração diferencial dos íons sob efeito do fluxo eletrosmótico, seguida de detecção condutométrica.

2

Objetivos

2- Objetivos

Com o propósito mais geral de estender a gama de aplicações da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato direto com os analitos e de ampliar sua sensibilidade e seletividade, bem como reduzir os efeitos da matriz de amostras complexas nas quais se queira determinar baixas concentrações de aminas ou de metais, pode-se distinguir os seguintes objetivos principais:

1) Avaliar a aplicabilidade do detector condutométrico sem contato a sistemas de análise em fluxo, inclusive para sincronizar a injeção hidrodinâmica no capilar da CE com o exato momento da passagem do plug de amostra no entorno do capilar;

2) Como pré-requisito aos objetivos 3 e 4, estabelecer condições de trabalho e ampliar o leque de aplicações relatadas na literatura para a CE-C4D aplicada à separação e determinação de aminas de baixo peso molecular e de cátions de metais pesados e semi-metais;

3) Conceber dispositivos e sistemas de extração e pré-concentração em fluxo baseados em filamentos microporosos de polipropileno, diretamente interfaceáveis com a CE, preferencialmente miniaturizáveis e automatizáveis;

4) Verificar a exeqüibilidade da idéia de combinar a pré-concentração eletroquímica em fluxo de metais em amostras diluídas (por eletrodeposição seguida de redissolução), criando células e dispositivos para compor o sistema ECPC-FIA-CE-C4D e buscando sua miniaturização e automação.

3

Materiais

e Métodos

3- Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram de grau P.A., salvo quando mencionado o contrário. Foram utilizados NaCl, NaOH, Na₂HPO₄, ácido acético, acetato de sódio da Merck. Foi utilizada L-histidina da Sigma e o ácido láctico fornecido da CAAL. No preparo das soluções de íons metálicos para injeção em CE foram utilizadas soluções padrão comerciais, estanho a 993 ppm e zinco, chumbo, cobre, cádmio, tálio, arsênio, prata, mercúrio, níquel e cobalto 1000 ppm, da Merck ou Sigma-Aldrich.

As aminas utilizadas possuíam teor entre 99 e 99,9%, sendo utilizadas nas formas de seus sais de cloridrato (cloridrato de metilamina, cloridrato de dimetilamina, cloridrato de trimetilamina, cloridrato de etilamina, cloridrato de dietilamina, cloridrato de trietilamina, cloridrato de 1,3-diaminopropano, cloridrato de 1,4-diaminobutano, cloridrato de 1,5-diamino pentano) ou na forma líquida (n-butilamina, s-butilamina, t-butilamina, hexilamina), obtidas da Merck, Sigma-Aldrich ou Acros.

A água deionizada utilizada como solvente foi obtida com equipamento Nnanopure da Barnstead, alimentado com água purificada por osmose reversa.

3.2 – Equipamentos

Os equipamentos de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato utilizados, foram construídos no próprio laboratório, e se encontram descritos em Tese de Doutorado defendida no IQ-USP[27].

O potenciostato utilizado neste trabalho para as medidas voltamétricas e para os estudos de pré-concentração eletroquímica, foi o modelo μ Autolab tipo III da Echo-Chemie, controlado por programa GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4,9,005.

O espectrofotômetro utilizado foi o modelo 8452A da Hewlett Parckard, com detecção por arranjo de diodos.

Para propulsão das soluções foi utilizada bomba peristáltica marca Ismatec modelo MS-Reglo.

A propulsão das soluções nos experimentos de automatização da extração líquido-gás-líquido em fluxo foi realizada utilizando-se microbombas modelo 120SP1210-5TE, fabricadas por BioChem Valve Inc. e comutação de fluxo com válvulas solenóide da NS-Research Incorporate, modelo 161T031.

O filamento microporoso de polipropileno, Oxypyhan[®], foi gentilmente doado pela empresa Membrana (Wuppertal, Alemanha), pertencente à Polypore. As características da membrana serão apresentadas no contexto do próximo capítulo.

4

Resultados

e Discussão

4-Resultados e Discussão

4.1 - Utilização do C4D em FIA

Os sistemas de detecção condutométrica sem contato, nos moldes da montagem eletrônica sugerida por Lago e Fracassi[26], vêm sendo crescentemente utilizados em CE, bem como noutras aplicações, inclusive análise em fluxo. O sucesso alcançado pode ser aquilatado em recente trabalho de revisão[49]. Nesta tese adaptou-se o C4D ao sistema FIA por simples troca dos eletrodos anelares projetados para capilar de sílica, por outros de maior diâmetro, ajustados à tubulação de polietileno ($d_i = 0,6\text{mm}$) utilizada em sistemas FIA convencionais.

Embora o C4D seja bastante adequado para ser utilizado em CE, por ser um detector universal, isso pode causar um grande problema na sua aplicação em sistemas FIA, devido à sua falta de seletividade. Via de regra, sua aplicabilidade se restringe a soluções de amostras com matriz isenta de componentes iônicos ou ionizáveis que possam variar de amostra a amostra, pois mesmo ao se tentar utilizar métodos como adição de padrão, é muito difícil avaliar qual parcela da condutividade total da solução (e do sinal analítico obtido) é devida especificamente ao analito de interesse.

Sua utilização, no entanto, pode ser viabilizada desde que se processe uma etapa prévia à de detecção que constitua em um tratamento da amostra (como por exemplo troca de matriz, diálise, extração líquido-líquido ou gás-líquido) em que se tenha o analito em questão em um meio bem conhecido, ou ainda a destruição da

espécie de interesse para uma determinação diferencial. Neste contexto, é proposta a construção de um sistema englobando FIA-C4D com duplo propósito: i) acoplamento ao sistema FIA-CE como um detector para possibilitar sincronização precisa e automação da transferência de amostra na interface entre os dois sistemas, sem propósito de quantificação direta de analitos; e ii) utilização do C4D como detector em sistema FIA, em substituição ao detector com contato utilizado em diversos métodos FIA publicados, em que a seletividade é conferida ao método por etapas prévias como, por exemplo, uma extração gás-líquido ou líquido-gás-líquido, com ionização na fase aceptora.

Utilizando-se o C4D acoplado ao percurso FIA, foi montado sistema de análise como indicado na figura 4, a seguir em que se percebe uma configuração em linha única para injeção de amostra.

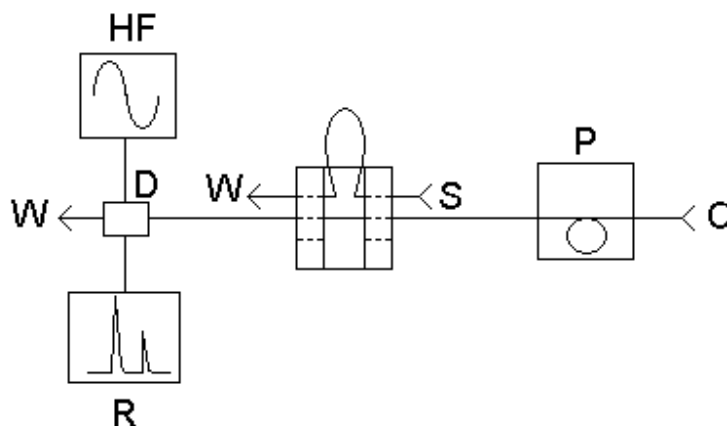


Figura 4 – Sistema FIA utilizado: C – fluido transportador, P – bomba peristáltica, S – amostra, W – descarte, D – detector, R – registrador, HF – fonte de alta frequência.

Como amostra-modelo foi utilizada solução aquosa de NaCl, introduzida em fluxo de água destilada saturada de ar, apenas para verificar as modificações da condutividade durante as injeções da solução e avaliação dos sinais analíticos obtidos.

4.1.1 – Resultados

A utilização do C4D como ferramenta de sincronização na interface FIA-CE permite pensar em duas situações em que as características de detecção seriam diferentes: i) introduzir a amostra em fluxo transportador de água deionizada, gerando sinal transiente na forma de um “pico positivo” e ii) utilizar um fluxo transportador constituído pelo tampão de corrida da CE, caso em que o tempo de lavagem da região da interface, para início da corrida eletroforética, pode ser bastante reduzido. Estas duas situações de injeção foram então testadas.

Para efetuar os testes uma solução aquosa de NaCl foi escolhida como composto modelo, sendo injetada nas concentrações de 35, 50 e 65 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em fluxo transportador de água deionizada ou de tampão ácido láctico/histidina (10/10 mmol L^{-1}). Optou-se pela utilização de volumes pequenos de injeção (50, 100 e 150 μL), compatíveis tanto com os diminutos volumes resultantes dos processos de tratamento e pré-concentração de amostras quanto com os volumes comumente utilizados em FIA. Os resultados destes conjuntos de injeções podem ser vistos nos diagramas mostrados na figura 5 e as alturas de pico seguidas de suas médias e desvios padrão e relativo (%) são listados nas tabelas 1 e 2. A escolha das concentrações a serem injetadas foi

feita com base em um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, sendo que todas as injeções foram feitas em pseudo-triplicatas (triplicatas seqüenciais).

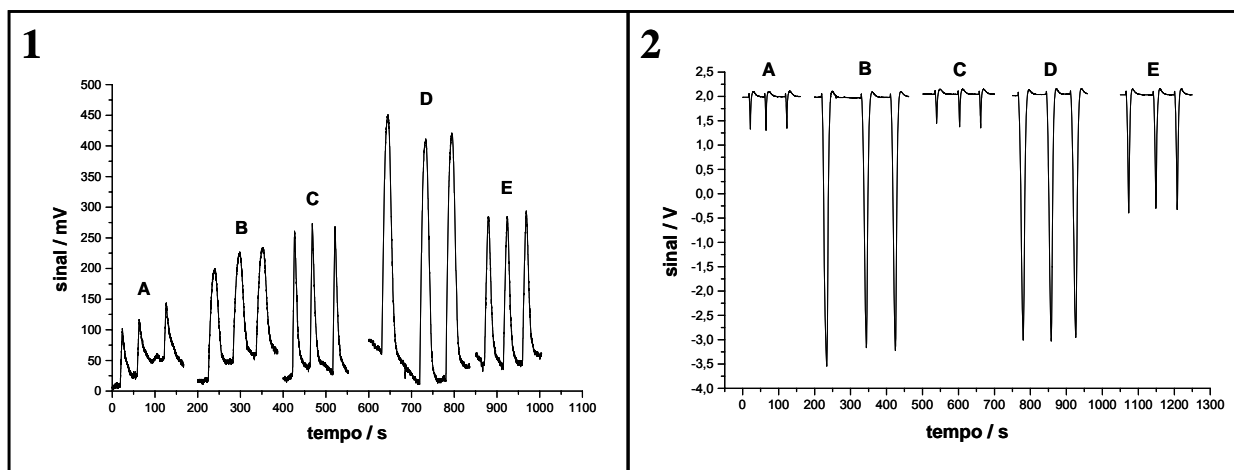


Figura 5 – Diagramas obtidos no sistema FIA-C4D, para injeção de soluções de NaCl em fluxo de: 1) água deionizada e 2) tampão ácido láctico/histidina, 10/10mmol L⁻¹. Injeções: A - 50µL de NaCl 35µmol L⁻¹, B - 150µL de NaCl 35µmol L⁻¹, C - 50µL de NaCl 65µmol L⁻¹, D - 150µL de NaCl 65µmol L⁻¹ e E - 100µL de NaCl 50µmol L⁻¹.

Tabela 1 – Resultados dos picos de FIA-C4D para fatorial 2^2 com fluido transportador água deionizada.

Fluido transportador: Água deionizada						
Experimento	Sinal 1 / mV	Sinal 2 / mV	Sinal 3 / mV	Média / mV	Desvio padrão / mV	Desvio relativo (%)
(-, -) 35 µM, 50 µL	26,8	26,0	26,2	26,3	0,42	1,6
(-, +) 35 µM, 150 µL	52,0	51,0	49,8	50,9	1,10	2,2
(+, -) 65 µM, 50 µL	67,0	66,0	68,0	67,0	1,00	1,5
(+, +) 65 µM, 150 µL	111,5	113,0	115,0	113,2	1,76	1,6
(0,0) 50 µM, 100 µL	68,2	70,0	71,0	69,7	1,42	2,0

Tabela 2 – Resultados dos picos de FIA-C4D para fatorial 2² com fluido transportador tampão Ácido Lático/ Histidina.

Fluido transportador: Tampão Ácido Lático/ Histidina⁻						
Experimento	Sinal 1 / mV	Sinal 2 / mV	Sinal 3 / mV	Média / mV	Desvio padrão / mV	Desvio relativo (%)
(-, -) 35 µM, 50 µL	14,5	15,0	14,0	14,5	0,50	3,4
(-, +) 35 µM, 150 µL	121,8*	113,0	114,8	116,5	1,27	1,1
(+, -) 65 µM, 50µL	13,0	14,8	15,0	14,3	1,10	7,7
(+, +) 65 µM, 150 µL	111,0	111,5	110,0	110,8	0,76	0,7
(0,0) 50 µM, 100 µL	53,8	51,8	52,0	52,5	1,10	2,1

* dado rejeitado devido a grande discrepância.

De maneira bastante simples verifica-se que, em relação aos níveis estabelecidos para os fatores estudados, quando se usa como fluido transportador água deionizada, há uma relação direta da resposta do detector, refletido nas alturas dos picos, em função da concentração (variações da ordem de 1,2 a 1,5 vezes) como mostrado na tabela 1. Pode ser observado na Figura 5, o alargamento dos picos e aumento significativo do sinal em função do aumento do volume de amostra injetado (variações de cerca de 70 a 90%). As magnitudes dos desvios relativos obtidos nas medidas encontram-se entre 1,5 – 2,2%, que significa boa repetibilidade do sistema. Estas características permitem que se infira a possibilidade de aplicação do detector C4D como instrumento de análise acoplado em sistemas FIA, para a faixa de concentração avaliada, embora fossem desejáveis estudos visando direcionar a melhoria das condições experimentais rumando à melhoria no limite de detecção do sistema.

Para a injeção das soluções de NaCl em fluxo transportador de tampão Figura 5.2 e Tabela 2, foram observados picos negativos, que podem ser explicados devido à menor condutividade da amostra em relação ao transportador. Verifica-se, no entanto, que ao variar as concentrações da amostra, mantendo fixos os volumes injetados, a variação dos sinais é muito pequena (entre 1,5 a 5,0%), podendo ser explicadas pelo próprio desvio observado nas medidas (0,7 a 7,7%). Contudo, a variação do volume de amostra injetado mostra ser um fator significativo na variação dos sinais obtidos (variações da ordem de 7 vezes). Pode-se atribuir esta grande variação à diferença entre a condutividade da solução injetada frente ao “concentrado” tampão utilizado. As variações muito pequenas de magnitude nas alturas dos picos para a faixa de concentração utilizada indicam que o sistema proposto não deva ser adequado para efetuar quantificação de espécies dentro das faixas de concentração proposta. No entanto, como no caso em que se utilizam volumes de amostra da ordem de 150 μ L, o sistema pode servir perfeitamente para realizar o sincronismo FIA-CE, devido à facilidade de detectar as grandes variações envolvidas no sinal do detector quando da passagem da amostra.

4.2 – Determinação de aminas

As aminas são uma classe de substâncias que despertam grande interesse em determinações analíticas, devido à sua vasta gama de ocorrências e aplicações, que vão de neurotransmissores e fármacos a indicadores do estado de decomposição de

alimentos e indicadores ambientais. A literatura também nos apresenta grande variedade de métodos de determinação de amins utilizando técnicas envolvendo extrações com membranas entre fases gasosa-líquida, gasosa-gasosa ou líquida-líquida. Nas determinações de amins por eletroforese capilar registradas na literatura recente[50], empregam-se, principalmente, detecção óptica[51-56], mas também CE-UV CE-MS[57], amperométrica[58] e condutométrica com[59] ou sem contato[60, 61], esta última utilizada nesta tese.

Dessa forma julgou-se interessante estabelecer, primeiramente, as condições para separação por CE e detecção por C4D de amins de baixo peso molecular, bem como de algumas diaminas relatadas como indicadores de grau de decomposição de alimentos, visando sua possível integração posterior nos processos de extração gás-líquido e líquido-gás-líquido.

4.2.1 – Determinação de amins por CE-C4D

Os testes descritos a seguir foram realizados em equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato desenvolvido neste mesmo grupo de pesquisa[26]. Foram preparadas soluções-estoque $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ das amins utilizadas, com adição de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, para protonação das mesmas, evitando perdas por volatilização.

Considerando a proximidade de pKa's das amins (a maioria entre 9,5 e 10,5) e as características específicas do C4D, foram estudados 4 eletrólitos de corrida: a)

MES/histidina, 20/20 mmol L⁻¹, pH 6,0; b) CHES, 20 mmol L⁻¹, pH 9,5; c) CAPS, 20 mmol L⁻¹, pH 10,0 e d) ácido acético 50mM.

Os melhores resultados de separação foram obtidos para o tampão MES/Histidina, como indicado na figura 6, levando à resolução de 16 aminas juntamente com amônio. A utilização dos tampões CHES e CAPS, com pH próximo ao pKa das aminas, não levou à esperada melhora da separação, pela alteração dos tempos de migração das espécies. A utilização de solução de ácido acético 0,5 mol L⁻¹, como indicado por Chong & Hauser[60], resultou em boa razão sinal/ruído para detecção indireta das espécies (picos negativos em relação à linha base), em função da alta mobilidade do eletrólito de corrida, entretanto, foi obtida melhor separação para o tampão escolhido.

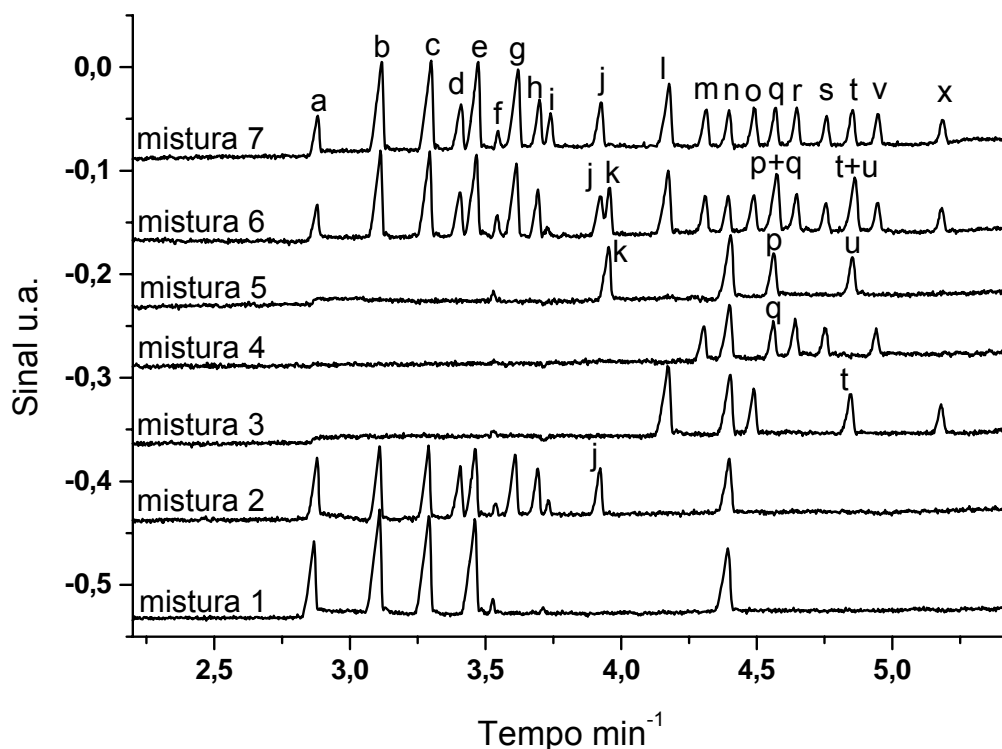


Figura 6 – Separação de misturas de aminas por eletroforese capilar. **Mistura 1:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de amônio; 1,3-diaminopropano (1,3-DAP); 1,4-diaminobutano (1,4-DAB); 1,5-diaminopentano (1,5-DAP) + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ . **Mistura 2:** solução como Mistura 1 + $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilamina (MMA); 1,6-diaminohexano (1,6-DAH); dimetilamina (DMA) e trimetilamina (TMA). **Mistura 3:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de etanolamina (EtoIA); DMAE; dietanolamina (diEtoIA); trietanolamina (triEtoIA) + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ . **Mistura 4:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de propilamina (PA); n-butilamina (NBA); sec-butilamina (SBA); terc-butilamina (TBA); hexilamina (HA) + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ . **Mistura 5:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de etilamina (MEA); dietilamina (DEA); trietilamina (TEA) + $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Li^+ . **Mistura 6:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de todas as espécies: NH_4^+ (a), 1,3-DAP(b); 1,4-DAB(c); MMA(d); 1,5-DAP(e); 1,6-DAH(g); DMA(h); TMA(j); MEA(k); EtoIA(l); PA(m); Li^+ (n); DMAE(o); NBA(p); DEA(q); SBA(r); TBA(s); diEtoIA(t); TEA(u); HA(v); triEtoIA(x). **Mistura 7:** solução $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NH_4^+ (a), 1,3-DAP(b); 1,4-DAB(c); MMA(d); 1,5-DAP(e); 1,6-DAH(g); DMA(h); TMA(j); EtoIA(l); PA(m); Li^+ (n); DMAE(o); NBA(p); SBA(r); TBA(s); diEtoIA(t); HA(v); triEtoIA(x). f e i – picos desconhecidos. Condições de corrida: -25 kV , tampão MES/histidina, $20/20 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6,0, capilar de sílica de $75 \mu\text{m}$ d.i. ($L_{\text{total}}=70\text{cm}$, $L_{\text{efetivo}}=60\text{cm}$) e injeção hidrodinâmica de 10 cm de coluna d'água durante 30 s.

Como indicado na figura acima, para o método proposto, foi obtida a separação com resolução total das 4 diaminas estudadas (1,3-DAP, 1,4-DAB, 1,5-DAP e 1,6-DAH) e de mais 12 monoaminas primárias (MMA, PA, NBA, SBA, TBA, EtolA, HA), secundárias (DMA, diEtolA) e terciárias (TMA, DMAE, triEtolA), além do íon amônio, num total de 17 espécies, utilizando Li^+ como padrão interno, para um tempo de corrida inferior a 5,5 minutos. Destaca-se, também, a boa separação entre os isômeros NBA, SBA e TBA. Ressalta-se que, frente a outros trabalhos indicados na literatura para determinação de aminas por CE-C4D[59, 60], o número de espécies separado nesta tese é superior, para tempos de análise comparáveis. Somente por CE-UV-MS, Fekete e cols.[57] alcançaram número comparável, todavia, necessitando praticamente o dobro do tempo.

Dentre o total das 20 espécies estudadas, obteve-se co-migração parcial entre TMA e MEA, picos **j** e **k** na figura 6, além de sobreposição total dos picos de NBA (**p**) e DEA (**q**) e entre diEtolA (**t**) e TEA (**u**), cabendo estudos adicionais de busca de reagentes seletivos na tentativa de promover a separação total destas aminas.

As espécies estudadas incluem espécies de interesse prático, como indicadores biológicos de decomposição de carnes e alimentos, como putrescina (1,4-DAB) e cadaverina (1,5-DAP), além de aminas voláteis que atuam como indicadores biológicos presentes em pescados (p. ex. MMA, DMA, TMA, MEA) ou espécies utilizadas em formulações cosméticas (p. ex. DMAE, EtolA, diEtolA), entre outras aplicações.

Considerando a separação obtida para o método proposto, foi avaliada a linearidade da resposta à concentração das diferentes espécies. Para tal, foram preparadas soluções de 6 padrões de mistura destas 16 aminas mais amônio, conforme

indicado na tabela 4, utilizando-se Li^+ como padrão interno, sendo os respectivos coeficientes (A e B) das regressões lineares obtidos para tal calibração, juntamente com seus coeficientes de correlação linear (R), indicados na tabela 5. Todas as respostas foram expressas de forma relativa, ou seja, como razão entre as áreas de pico de cada analito e a do padrão de Li^+ adicionado.

Tabela 4 – Matriz de concentrações (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) das soluções de aminas.

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6
NH_4^+	40	60	80	0	10	20
1,3-DAP	10	20	40	60	80	0
1,4-DAB	0	80	60	40	20	10
MMA	10	20	40	60	80	0
1,5-DAP	60	40	20	10	0	80
1,6-DAH	10	20	40	60	80	0
DMA	60	40	20	10	0	80
TMA	40	60	80	0	10	20
EtolA	80	0	10	20	40	60
PA	60	40	20	10	0	80
DMAE	0	80	60	40	20	10
NBA	80	0	10	20	40	60
SBA	20	10	0	80	60	40
TBA	0	80	60	40	20	10
diEtolA	20	10	0	80	60	40
HA	80	0	10	20	40	60
triEtolA	40	60	80	0	10	20
Li^+	30	30	30	30	30	30

Tabela 5 – Curvas de Calibração das aminas, $S = A + B \cdot C_{\text{amina}}$ para concentrações em ($\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo S a razão entre a área do pico da amina e a área do pico do padrão de Li^+ .

Analito	A e (desvio padrão)	B e (desvio padrão)	R
NH_4^+	$-6 \cdot 10^{-3} (9 \cdot 10^{-3})$	$342 \cdot 10^{-4} (2 \cdot 10^{-4})$	0,9999
1,3-DAP	$-1,3 \cdot 10^{-1} (1,0 \cdot 10^{-1})$	$58 \cdot 10^{-3} (2 \cdot 10^{-3})$	0,9968
1,4-DAB	$5 \cdot 10^{-2} (3 \cdot 10^{-2})$	$377 \cdot 10^{-4} (6 \cdot 10^{-4})$	0,9996
MMA	$-1 \cdot 10^{-2} (2 \cdot 10^{-2})$	$244 \cdot 10^{-4} (5 \cdot 10^{-4})$	0,9991
1,5-DAP	$-0,9 \cdot 10^{-1} (1,4 \cdot 10^{-1})$	$77 \cdot 10^{-3} (3 \cdot 10^{-3})$	0,9967
1,6-DAH	$0,2 \cdot 10^{-2} (3 \cdot 10^{-2})$	$677 \cdot 10^{-4} (7 \cdot 10^{-4})$	0,9998
DMA	$-0,3 \cdot 10^{-2} (7 \cdot 10^{-2})$	$30,1 \cdot 10^{-3} (1,4 \cdot 10^{-3})$	0,9954
TMA	$-0,9 \cdot 10^{-2} (1,5 \cdot 10^{-2})$	$212 \cdot 10^{-4} (3 \cdot 10^{-4})$	0,9995
EtolA	$-0,2 \cdot 10^{-2} (2 \cdot 10^{-2})$	$663 \cdot 10^{-4} (5 \cdot 10^{-4})$	0,9999
PA	$5 \cdot 10^{-2} (2 \cdot 10^{-2})$	$104 \cdot 10^{-4} (5 \cdot 10^{-4})$	0,9945
DMAE	$-4 \cdot 10^{-2} (5 \cdot 10^{-2})$	$33,9 \cdot 10^{-3} (1,1 \cdot 10^{-3})$	0,9980
NBA	$-2 \cdot 10^{-2} (3 \cdot 10^{-2})$	$149 \cdot 10^{-4} (7 \cdot 10^{-4})$	0,9995
SBA	$1,4 \cdot 10^{-2} (1,7 \cdot 10^{-2})$	$123 \cdot 10^{-4} (4 \cdot 10^{-4})$	0,9981
TBA	$-1,9 \cdot 10^{-2} (1,9 \cdot 10^{-2})$	$74 \cdot 10^{-4} (4 \cdot 10^{-4})$	0,9932
diEtolA	$-5 \cdot 10^{-2} (7 \cdot 10^{-2})$	$32,9 \cdot 10^{-3} (1,4 \cdot 10^{-3})$	0,9960
HÁ	$0,2 \cdot 10^{-2} (1,4 \cdot 10^{-2})$	$79 \cdot 10^{-4} (3 \cdot 10^{-4})$	0,9969
triEtolA	$0 (4 \cdot 10^{-2})$	$211 \cdot 10^{-4} (9 \cdot 10^{-4})$	0,9964
TEA*	$-4 \cdot 10^{-2} (3 \cdot 10^{-2})$	$194 \cdot 10^{-4} (7 \cdot 10^{-4})$	0,9976

* TEA determinada em corrida separada.

Os resultados da tabela 5 comprovam que o método de separação proposto, além de permitir a resolução do grande número de aminas de baixo peso molecular constantes da tabela 4, também apresenta boa resposta linear, sendo adequado, pois, à quantificação simultânea das mesmas por CE-C4D.

4.2.2 – Desenvolvimento de metodologia para determinação de DMAE em formulações cosméticas

Presente em peixes como o salmão e a anchova, precursor bioquímico da colina e da acetilcolina no cérebro[62], o dimetilaminoetanol (DMAE) é um análogo da colina e foi introduzido na medicina para o tratamento de desordens neurológicas, como esquizofrenia[63], hiperatividade infantil[64, 65] e discinesia tardia[66, 67]. Entretanto, um efeito colateral relatado por pacientes, o retesamento da musculatura maxilo-facial, deu origem à sua utilização como agente firmador em formulações cosméticas desde a década de 90[68]. Seu uso encontra-se regulamentado no Brasil desde 2003[69]. Há, também, artigos avaliando a eficácia do DMAE como agente anti-envelhecimento[68, 70, 71] e propondo possíveis mecanismos para tal ação[72].

Estudos atribuem três ações farmacológicas principais ao DMAE: estimulador na produção de acetilcolina, efeito antiinflamatório e atividade anti-envelhecimento[68]. Trabalhos que tratam da análise de aminas em cosméticos utilizam, preferencialmente, técnicas de separação cromatográficas, seja na análise de N-nitrosaminas por HPLC[73] ou GC[74], seja na análise de etanolaminas por IEC[75]. Devido à presença do DMAE nos campos alimentar, farmacêutico e cosmético, e à ausência de método padrão para sua determinação, em trabalho realizado em colaboração com aluna de mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP[76], desenvolveu-se metodologia baseada na separação de aminas por CE-C4D para quantificação de

DMAE em formulações cosméticas, inclusive, com a possibilidade de análise simultânea de outras espécies[77].

4.2.2.1 – Determinação de DMAE por CE-C4D

O desafio analítico enfrentado consistiu em conseguir determinar quantitativa- e seletivamente o DMAE em três tipos de matriz usuais na área de cosméticos: creme, gel-creme e gel. Essas matrizes, isentas de DMAE, foram preparadas por aluna da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo[76]. A elas se adicionou DMAE para obter um título final de 3% (m/m) em DMAE mediante homogeneização em agitador tipo vortex. Como amostra, tomou-se 20 mg da do cosmético e dissolveu-se em 100mL de água sob agitação ultrassônica por 20 minutos. As condições de análise estabelecidas para a técnica de CE-C4D foram, utilizando-se tampão (pH 6,0) MES/histidina, 20/20 mmol L⁻¹ como eletrólito as seguintes: adição de Rb⁺ como padrão-interno, capilar de sílica fundida de 75 µm d.i. e 360 µm d.e. (L_{total}=60cm, L_{efetivo}=50cm), potencial de corrida de -25 kV e injeção hidrodinâmica (30 s, 10 cm H₂O). As etapas requeridas são ilustradas na figura 7. A substituição do Li⁺ pelo Rb⁺ deu-se por causa da proximidade dos picos de DMAE e Li⁺, sendo que o Rb⁺ certamente não figura em formulações cosméticas.

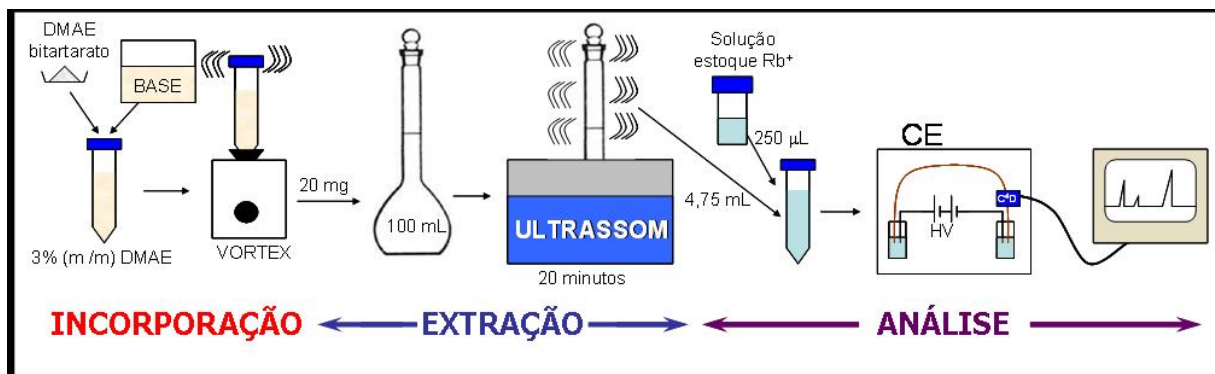


Figura 7- Esquema do procedimento experimental utilizado, incluindo as etapas de: i) Incorporação de bitartrato de DMAE na amostra, ii) Extração de 20 mg de amostra em 100 mL de água e iii) Análise por CE-C4D após adição de padrão interno na amostra extraída.

A figura 8 demonstra que o método de separação apresenta elevada seletividade, permitindo identificar o DMAE mesmo na presença de outros cátions, como metais alcalinos e alcalino terrosos (Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), amônio e outras aminas (triethylamina, etanolamina, dietanolamina e trietanolamina) presentes na lista da *European INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)*, a qual indica os princípios-ativos permitidos na fabricação de cosméticos, e que, portanto, poderiam interferir nesta análise.

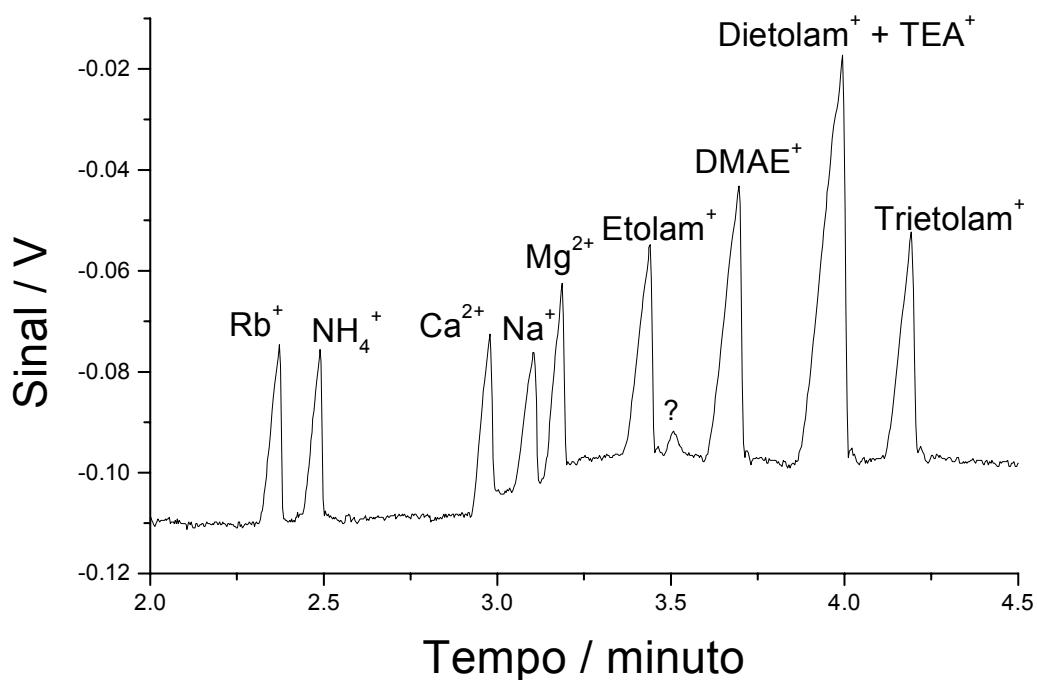


Figura 8 - Eletroferograma de uma mistura de cátions. NH_4^+ , Rb^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, etanolamina (Etolam), dietanolamina (Dietolam), trietanolamina (Trietolam) trietilamina (TEA) e DMAE $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. C4D operando a 550 kHz e 2 Vpp, tampão (pH 6,0) MES/histidina, $20/20 \text{ mmol L}^{-1}$ como eletrólito de corrida, capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ d.i. e $360 \mu\text{m}$ d.e. com 60 cm de comprimento (50 cm efetivo), potencial de corrida de -25kV e injeção hidrodinâmica (30 s, $10 \text{ cmH}_2\text{O}$).

Foram efetuadas injeções de soluções de DMAE com concentrações variáveis entre $10 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e $9,95 \text{ mmol L}^{-1}$, traçando-se, a partir delas a respectiva curva de calibração, como pode ser observado na figura 9.

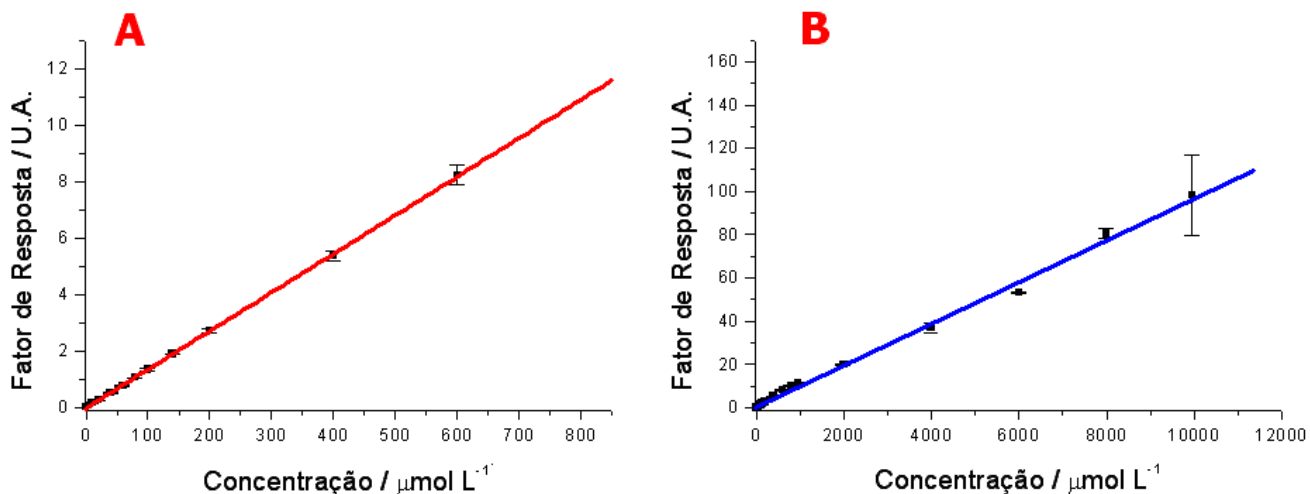


Figura 9 - Curvas de calibração para soluções de bitartrato de dimetilaminoetanol (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 140, 200, 400, 600, 800 e 950 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2, 4, 6, 8 e 9,95 mmol L^{-1}). **(A) Reta Vermelha**: aproximação linear para a região de menor concentração (0 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) - F.R. = $-3,5 \cdot 10^{-2} (\pm 1,5 \cdot 10^{-2}) + 1367 \cdot 10^{-5} (\pm 7 \cdot 10^{-5}) \text{ Conc}$; $R = 0,999$ para $N = 11$. **(B) Reta Azul**: aproximação linear para a região de maior concentração (800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 10 mmol L^{-1}) - F.R. = $1 (\pm 2) + 96 \cdot 10^{-4} (\pm 4 \cdot 10^{-4}) \text{ Conc}$; $R = 0,997$ para $N = 7$. Sendo o Fator de Resposta (F.R.) a sensibilidade relativa obtida entre o sinal do analito e o sinal do padrão interno utilizado e Conc a concentração expressa em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Pode-se observar que o método apresenta ampla faixa de trabalho, desde que, em benefício da exatidão, se distinga duas regiões, uma para menores concentrações (10 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e outra para concentrações maiores, alcançando até 10 mmol L^{-1} . O método proposto alcançou limites de detecção de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (limites instrumentais calculados). A repetibilidade foi avaliada para 15 injeções consecutivas de uma solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DMAE, apresentando desvio padrão relativo de 2,0%.

Para avaliação da reprodutibilidade do método, segundo procedimento experimental indicado na Figura 10, visando avaliar possíveis problemas na

metodologia, como falta de reprodutibilidade na incorporação do analito na matriz de cosmético ou possível ineficiência no processo de extração da amostra fortificada, de alto teor orgânico, para o meio aquoso, os ensaios de recuperação foram feitos em triplicata, em um nível para cada uma das duas etapas (incorporação e extração) indicadas.

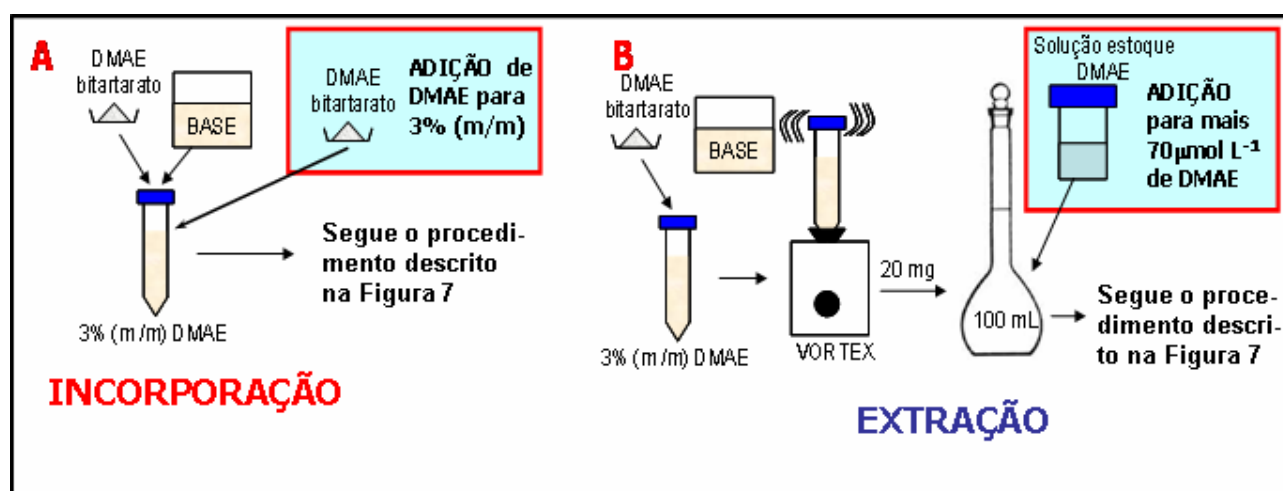


Figura 10 – Esquema do teste de Recuperação efetuado para as etapas de Incorporação (A) e Extração (B).

Como se verifica na tabela 6, o método apresenta boa repetibilidade e elevada recuperação em ambas as etapas, o que permite descartar a possibilidade de incorporação não-homogênea ou insuficiência na dissolução da amostra pelo método proposto. Com este resultado favorável, na continuidade dos estudos considerou-se suficiente realizar ensaios de recuperação para a incorporação de DMAE nas amostras.

Tabela 6 – Resultados dos testes de recuperação (em %) para as diferentes matrizes e cremes comerciais estudados.

Matriz	Incorporação	Extração
Creme	92 ± 4	99 ± 6
Gel-Creme	93 ± 3	91 ± 9
Gel	100 ± 4	101 ± 6

Após avaliação do método analítico proposto, foram realizadas as análises de 02 amostras reais de cremes e 02 amostras de gel-creme presentes no mercado. As amostras reais foram preparadas para análise segundo os procedimentos descritos acima e indicados na figura 7, exceto pela adição de DMAE, a qual só foi efetuada para os testes de recuperação em um nível, diretamente no creme, visando uma concentração de 64 mmol L⁻¹ na amostra final (equivalente a título 3%, m/m, em DMAE no creme). Os resultados obtidos das quantificações, bem como as recuperações obtidas podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7 – Determinação de DMAE em amostras Reais

Amostra	Título DMAE (desvio padrão) / % , m/m	Recuperação (%)
Creme 01	3,32 (0,24)	94 ± 4
Creme 02	2,63 (0,16)	92 ± 5
Gel-creme 01	< L.D.	98 ± 6
Gel-creme 02	1,75 (0,28)	102 ± 8

Os valores obtidos para a quantificação de DMAE em formulações cosméticas apresenta bons índices de recuperação, indicando que a metodologia é aplicável à determinação da espécie nas concentrações presentes em amostras reais disponíveis no mercado, embora a ausência de indicação da concentração do mesmo nos rótulos

não permita a comparação entre os valores obtidos e os indicados pelo fabricante. A amostra de Gel-creme 01 correspondia a um gel para acne, cujo princípio ativo era peróxido de benzoila e, embora indicasse a presença de DMAE em sua formulação, deve ter ficado abaixo do limite de detecção do método.

4.2.2.2 – Determinação de DMAE por Espectrofotometria UV-Vis

Além do desenvolvimento do método analítico para determinação de DMAE por CE-C4D, optou-se pelo desenvolvimento de método alternativo para comparação e validação do mesmo. Nesse sentido, frente à ausência de métodos analíticos de referência para a espécie em questão, métodos espectrofotométricos foram investigados, devido à sua simplicidade instrumental e larga aceitação. Há diversos métodos espectrofotométricos descritos na literatura para determinação de aminas primárias, secundárias e terciárias[78-81].

Estudos iniciais com a utilização de agentes cromóforos como Cu-EDTA[79] e m-dinitrobenzeno[78], não levaram a uma sensibilidade tão boa para a reação com DMAE quanto o p-cloranil[80]. Os estudos espectrofotométricos para determinação de DMAE foram conduzidos segundo adaptação do método proposto por Smith[80], em meio reacional de 1,4-dioxano / 2-propanol, 1:4 (v/v), embora Darwish[81], tenha, mais recentemente, determinado trimetazidina em meio de acetonitrila, utilizando método cinético.

Foi preparada solução 5% m/m de p-cloranil (20 mmol L^{-1}) em 1,4-dioxano. A massa adequada de DMAE bitartarato foi dissolvida na quantidade mínima de água

deionizada e o volume completado com 2-propanol para obter solução estoque 5 mmol L⁻¹ de DMAE. O meio reacional mantido para as leituras espectrofotométricas foi 1,4-dioxano / 2-propanol, 1:4 (v/v), levando a uma concentração final de 5 mmol L⁻¹ de p-cloranil.

A reação de p-cloranil com diversas espécies e em vários solventes, vem sendo estudada ao longo das últimas décadas[82-85], sendo relatada a formação de uma banda bastante intensa na região do espectro azul-violeta, com seu máximo de absorção entre 540-560 nm decorrente da formação de complexo de transferência de carga e outra banda, entre 420-440 nm, como pode ser verificado também na figura 11.

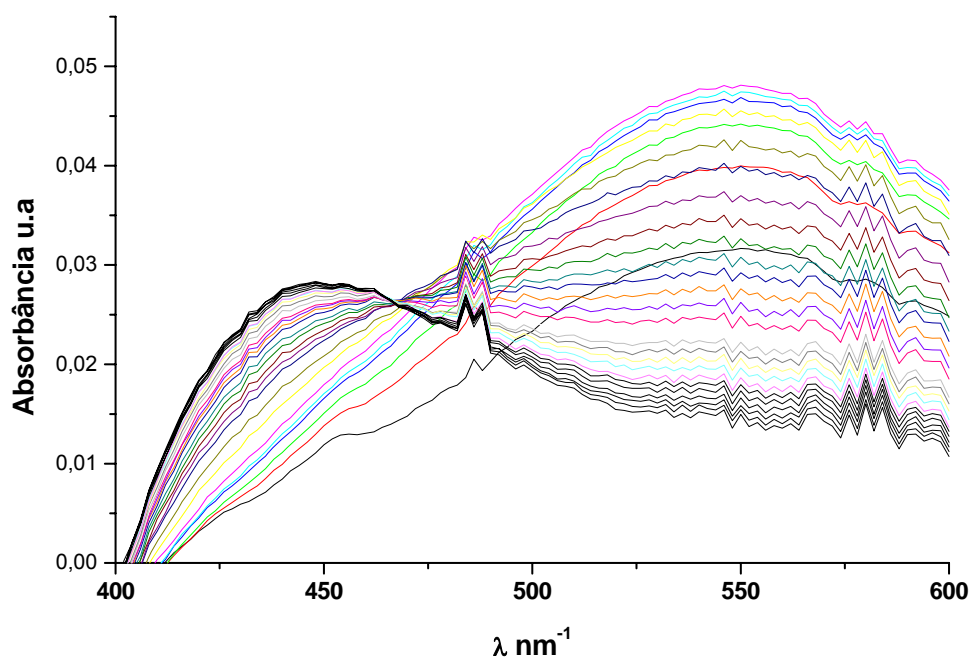


Figura 11 – Espectros eletrônicos registrados a cada 5 minutos para a reação entre DMAE (100 μmol L⁻¹) e p-cloranil (5 mmol L⁻¹) em 1,4-dioxano/2-propanol (1:4, v/v).

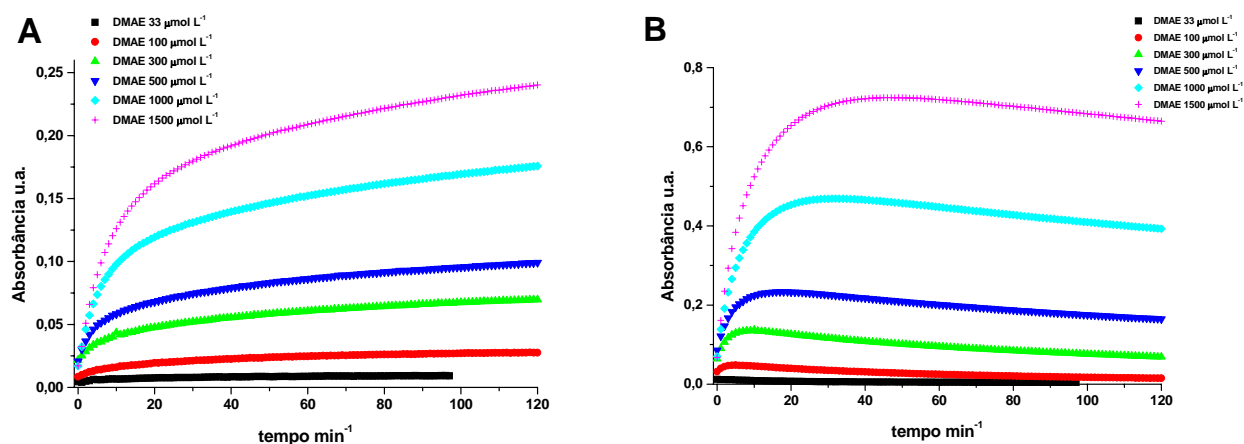


Figura 12 – Acompanhamento cinético da reação entre DMAE (33, 100, 300, 500 e 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e p-cloranil (5 mmol L^{-1}) em 1,4-dioxano/2-propanol (1:4, v/v), monitorados a (A) 440 nm e (B) 550 nm, com leituras a cada 1 minuto.

Com base no comportamento cinético da reação entre DMAE e p-cloranil observado na figura 12, optou-se por realizar a leitura da amostra após um período fixado, ao invés de utilizar o método cinético como proposto por Darwish[81] para a velocidade inicial da reação.

Foram preparadas soluções de DMAE de concentração 0, 67, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000 e 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e adicionadas a 5 mmol L^{-1} de p-cloranil em meio de 2-propanol/1,4-dioxano, 1:4 (v/v) e as leituras dos espectros eletrônicos destas registradas após 1, 2, 3, 5, 8 e 13 horas, de reação, para acompanhar a linearidade da resposta analítica para tempos elevados de reação. As curvas de calibração obtidas, para os comprimentos de onda de 440 e 550 nm podem ser observados na tabela 8, da qual se depreende que foi possível obter boas aproximações lineares.

Tabela 8 – Curvas de calibração para a reação entre DMAE e p-cloranil em tempos longos. Absorbância = $A + B.C_{\text{amina}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

λ (nm)	Tempo (h)	A (desvio padrão)	B (desvio padrão)	R	Faixa $\mu\text{mol L}^{-1}$
440	1	0,017 (0,004)	$89,7 (3) 10^{-6}$	0,994	0 a 3000
440	2	0,016 (0,002)	$95,0 (2) 10^{-6}$	0,998	0 a 3000
440	3	0,016 (0,003)	$99,5 (2) 10^{-6}$	0,997	0 a 3000
440	5	0,018 (0,004)	$107,9 (3) 10^{-6}$	0,996	0 a 3000
440	8	0,012 (0,005)	$112,8 (4) 10^{-6}$	0,994	0 a 3000
440	13	0,008 (0,004)	$120,5 (4) 10^{-6}$	0,996	0 a 3000
550	1	0,026 (0,010)	$285,5 (8) 10^{-6}$	0,997	0 a 3000
550	2	0,009 (0,007)	$323,9 (5) 10^{-6}$	0,999	0 a 3000
550	3	-0,005 (0,008)	$340,1 (6) 10^{-6}$	0,998	0 a 3000
550	5	-0,027 (0,015)	$35,6 (1,2) 10^{-5}$	0,995	0 a 3000
550	8	-0,018 (0,007)	$27,9 (1,1) 10^{-5}$	0,995	0 a 1500
550	13	-0,030 (0,008)	$26,3 (1,2) 10^{-5}$	0,993	0 a 1500

Para as curvas cinéticas obtidas indicadas na figura 14, calculou-se o erro médio das medidas considerando ± 2 minutos de variação na leitura das amostras, após uma hora de reação, obtendo-se valor máximo de 2,3%. Considerando a cinética inicial da reação entre DMAE e p-cloranil, e sua atenuação para tempos mais longos, optou-se por realizar a leitura após uma hora de reação, traçando a curva de calibração para a quantificação das amostras. O comprimento de onda de 550 nm foi escolhido para monitoramento da reação, pelo fato da banda de absorção observada nesse comprimento de onda ser mais intensa, levando a uma sensibilidade maior.

Para quantificação das amostras, foram utilizados as mesmas bases de gel, gel-creme e creme, incorporadas com bitartarato de DMAE (3% m/m) indicadas no item 4.2.1. A etapa de solubilização, foi realizada pela adição de 40 mg de amostra em 4 mL de 2-propanol, sob agitação em vortex por 20 minutos. Foi efetuada, então, a adição de 1 mL de solução 20 mmol p-cloranil em 1,4-dioxano, homogeneizada e

realizada a leitura após uma hora de reação a 550 nm. Os resultados obtidos para a incorporação de DMAE nas matrizes de cremes podem ser observadas na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados dos testes de recuperação para determinação de DMAE por espectrofotometria a 550 nm para as diferentes matrizes.

Matriz	Incorporação Recuperação (%)	Extração Recuperação (%)
Creme	91 ± 2	94 ± 5
Gel-Creme	95 ± 1	98 ± 4
Gel	91 ± 3	95 ± 3

Como descrito na literatura, a formação de complexo de transferência de carga com p-cloranil não é uma reação específica para DMAE, ocorrendo com diversas espécies, como, por exemplo, hidroxila, água, aminas em geral, dentre outras. Desta forma, o método espectrofotométrico foi utilizado apenas na quantificação de DMAE adicionado às bases galênicas, por diferença, para comparação com os valores obtidos por eletroforese capilar, não sendo aplicado às amostras comerciais, cujas matrizes desconhecidas não permitiriam atribuição do sinal analítico obtido exclusivamente ao DMAE.

Observa-se que a quantificação de DMAE nas amostras incorporadas, pelo método espectrofotométrico proposto, corroboram os resultados obtidos para a quantificação dos mesmos por CE-C4D, permitindo validar os resultados obtidos pelas duas técnicas.

4.3 – Extração gás-líquido com membrana microporosa

4.3.1 – Construção de dispositivo para extração gás-líquido

Para iniciar os estudos de extração, optou-se pela construção de cela para extração gás-líquido, vez que algumas características deste tipo de extração já foram previamente tratadas por membros deste grupo de pesquisa[39-41] e este tipo de extração apresenta certas vantagens sobre a extração líquido-líquido (inclusive em termos de simplicidade) notadamente coeficientes de difusão e permeação através da membrana mais favoráveis e possibilidade de se trabalhar na ausência de meio orgânico. Para isso foi utilizado filamento oco de polipropileno Oxyphan que a empresa Membrana fabrica para oxigenação de sangue. Estes filamentos possuem as seguintes dimensões: diâmetro externo 380 μm , diâmetro interno 280 μm , diâmetro médio dos poros 0,2 μm , alta densidade de poros e volume interno da ordem de 62 $\mu\text{L m}^{-1}$. Microscopia eletrônica de varredura da membrana microporosa em questão pode ser observada na figura 13.

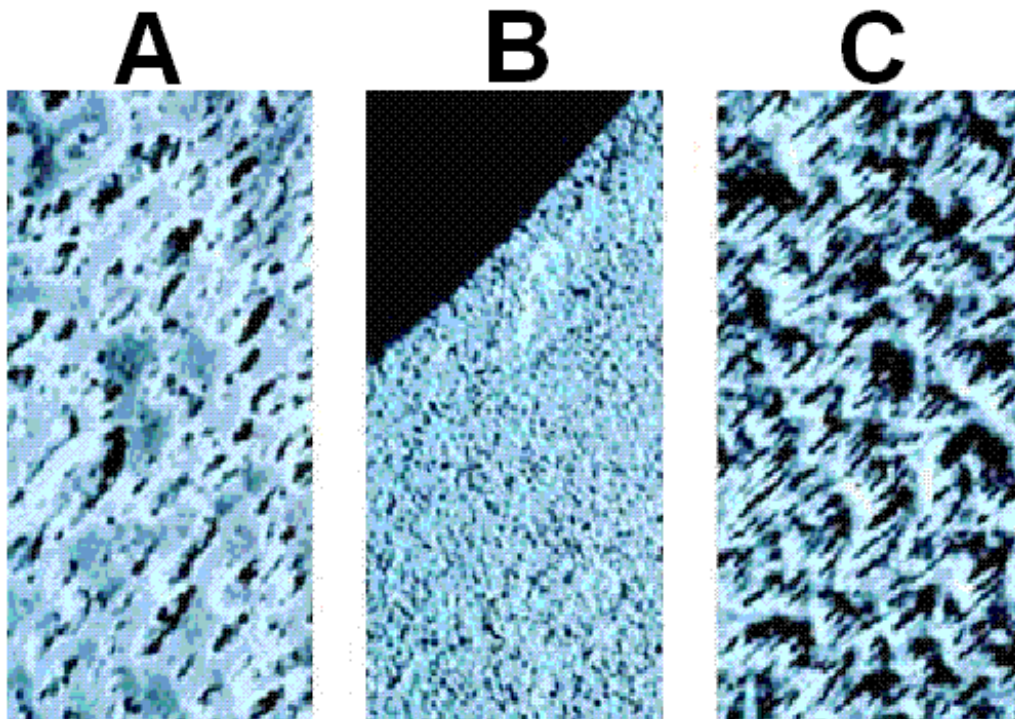


Figura 13 – Microscopia Eletrônica de Varredura do filamento de Oxyphan. A- Superfície Interna, B – Corte Transversal e C – Superfície Externa. Reproduzido do sítio eletrônico: http://www.membrana.de/oxygenation/products/pros_sem.htm, acessado em julho/2008.

As dimensões do filamento já denunciam as dificuldades de manuseio desses tubos no laboratório, vez que precisam ser conectados a materiais não permeáveis em suas extremidades e suportados mecanicamente para poderem ser utilizados. Dado o caráter hidrofóbico do polímero, a membrana absorve gordura com facilidade, tornando recomendável o uso de luvas em sua manipulação. Todavia, como os filamentos se dobram com facilidade, ficando danificadas no “vinco” indelével, e também sofrem colapso quando pressionados levemente, o uso de luvas complica o manuseio, razão pela qual se optou por dispensá-las e trabalhar com os dedos bem lavados com detergente.

O processo de confecção dos adaptadores situados nas extremidades do filamento de Oxyphan é ilustrado na figura 14. Seu desenvolvimento foi necessário para superar uma das principais limitações encontradas na montagem e disposição dos filamentos, que diz respeito ao fato destes serem facilmente danificados durante o manuseio. A estratégia utilizada na montagem destes conectores consiste em se passar um arame de tungstênio com d.e. inferior ao d.i. do filamento oco (B) pelo interior deste; em seguida, o filamento é esticado, afinando sua extremidade até um d.e. bem menor (C), a ponto de possibilitar sua introdução num tubo de Teflon, para o interior do qual é puxado até que todo o trecho em seu interior corresponda ao diâmetro original do Oxyphan (D); por último, retira-se o arame e corta-se a extremidade do filamento. Apesar de tubos de polietileno serem adequados ao mesmo propósito, preferiu-se o Teflon por sua maior resistência mecânica, térmica e química frente a solventes orgânicos.

Devido à pouca elasticidade dos tubos de Teflon em comparação ao Oxyphan, há risco de ocorrer dobra com constrição do fluxo neste, próximo à conexão. Por isso, um pedaço de tubo de silicone é colocado nesta região, para proteger o filamento (E). Concluindo a montagem, o excesso do filamento oco é então cortado bem rente ao final do tubo de Teflon e o arame de tungstênio é removido (F).

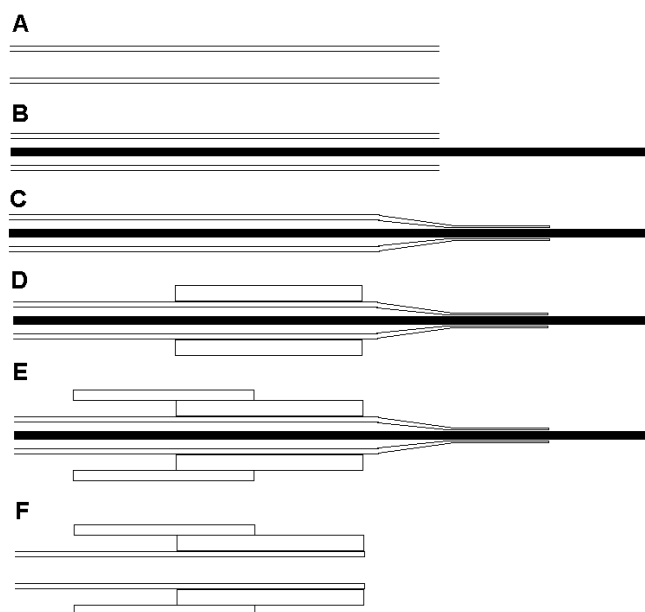


Figura 14 – Método para montagem dos conectores para o filamento de Oxyphan: A – filamento oco, B – introdução do fio de tungstênio, C – afinamento da extremidade do tubo, D – introdução no tubo de Teflon, E – introdução do Teflon no tubo de silicone, F – forma final da montagem, após retirada do arame de tungstênio e corte da ponta do filamento.

Com os filamentos, foi construído um sistema em que se pudesse promover a liberação gradual e concomitante coleta de um analito volátil de interesse para detecção em FIA-C4D. Este dispositivo é ilustrado na figura 15, sendo constituído basicamente de um pote de acrílico (A) cuja tampa (B) foi furada e adaptada para permitir o posicionamento do filamento de Oxyphan, (C) enrolado no interior da tampa e apoiado sobre algumas aletas de P.E.(D) permitindo sua fixação. Nas extremidades do filamento de Oxyphan foram colocadas conexões similares às descritas (E), fixadas na tampa do recipiente sob pressão por meio de um septo de borracha.

A cela de extração conta ainda com uma mini-ventoinha (F) (do tipo usado no resfriamento de microprocessadores) para promover transporte convectivo, com homogeneização da concentração das espécies gasosas no interior da cela. As partes metálicas expostas, como parafusos, foram cobertas com material polimérico para minimizar o ataque por aminas ou outros compostos voláteis liberados na extração. Em um recipiente (G) situado no fundo do pote, com agitador magnético é introduzida a amostra (p.ex., uma amina). Reagentes podem ser adicionados por meio um tubo de polietileno (H) que atravessa a tampa. Há também na tampa uma agulha de injeção (I) com $d.i. \cong 0,3 \text{ mm}$, que pode ser fechada com um septo ou aberta para equilibrar a pressão interna do frasco com a externa.

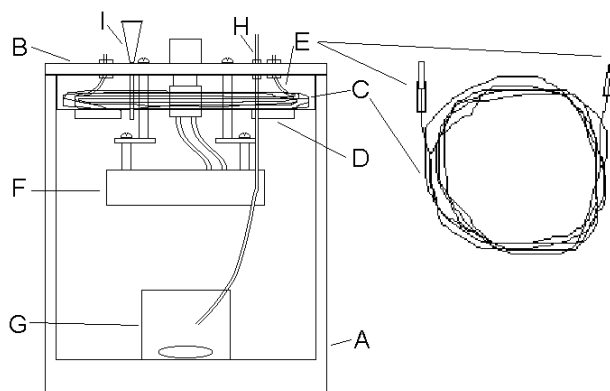


Figura 15 – Dispositivo de extração gás-líquido. A – pote de acrílico, B – tampa, C – filamento oco de Oxyphan, D – aletas de suporte, E – conectores, F – ventoinha, G – recipiente com agitação, H – tubo para introdução de amostras a reagentes, I – agulha equalizadora de pressão.

A cela de extração gasosa descrita foi incorporada ao sistema FIA, como demonstrado na figura 16. Nesta configuração, o filamento de Oxyphan utilizado ($L \cong 1,0 \text{ m}$, ou seja, $v \cong 62 \mu\text{L}$) foi conectado ao injetor comutador manual para FIA

(modelo desenvolvido no CENA), em substituição à alça de amostragem, o que possibilita que se renove o transportador (água deionizada), direcionando a solução acumulada na cela ao detector. O detector foi posicionado bem próximo à saída do injetor (reduzido percurso analítico).

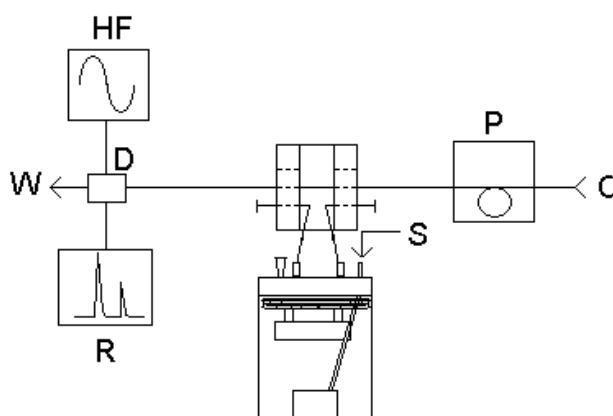


Figura 16 – Sistema FIA utilizado para extração gás-líquido: C – fluido transportador, P – bomba peristáltica, S – amostra/reagente, W – descarte, D – detector, R – registrador, HF – fonte de alta frequência.

4.3.2 – Avaliação do dispositivo proposto

Utilizando o sistema descrito na figura 16, escolheu-se como composto modelo metilamina, na forma de cloridrato, por possuir boa volatilidade a temperatura ambiente (pressão de vapor da metilamina 1396 mm de Hg a 25°C), usando-se como fluido transportador água deionizada. Foram colocados 2,5 mL de solução aquosa 30 mmol L⁻¹ de cloridrato de metilamina no recipiente sob agitação magnética, aos quais se adicionou 0,5 mL de tampão fosfato pH 9,5 para promover desprotonação do sal quaternário de amônio, promovendo a conseqüente liberação da metilamina, que

então difundia pelos poros do filamento de Oxyphan e era recolhida em solução aquosa no interior do filamento.

A adição de tampão pH 9,5 foi efetuada de uma só vez, com a agitação magnética ligada, mas com a ventoinha desligada, para que se pudesse acompanhar a evolução do sinal analítico obtido em função da gradual liberação de metilamina. Para tal, foram feitas injeções em intervalos regulares após 1 minuto de extração. Como pode ser observado no fiagrama apresentado na figura 17, há um perceptível aumento da concentração de metilamina no recipiente, que é refletido no aumento da magnitude dos picos, até se atingir um regime estacionário após aproximadamente 10 minutos.

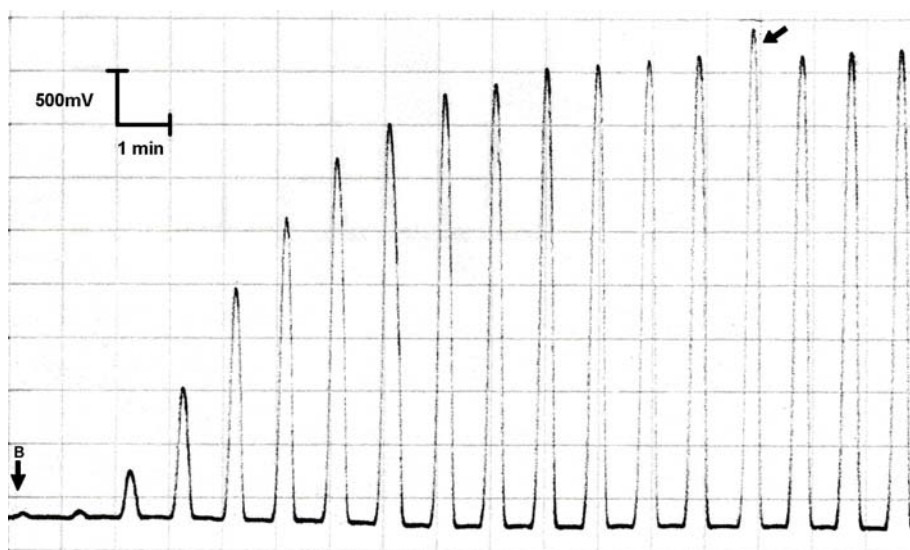


Figura 17 – Perfil de saturação de metilamina no recipiente, B – branco (comutação em ambiente isento de metilamina). O pico discriminado (↙)foi rejeitado por apresentar tempo de concentração ligeiramente diferente de 1 minuto.

O aumento da magnitude dos picos ao longo do tempo, com o crescimento da concentração de metilamina no recipiente revela que o sistema proposto responde

proporcionalmente às diferentes concentrações de analito presente, embora seja difícil avaliar a extensão desta relação entre sinal e concentração. Na tentativa de deixar mais claro este comportamento, o perfil das alturas de pico em função do tempo de liberação de amina é apresentado na figura 18.

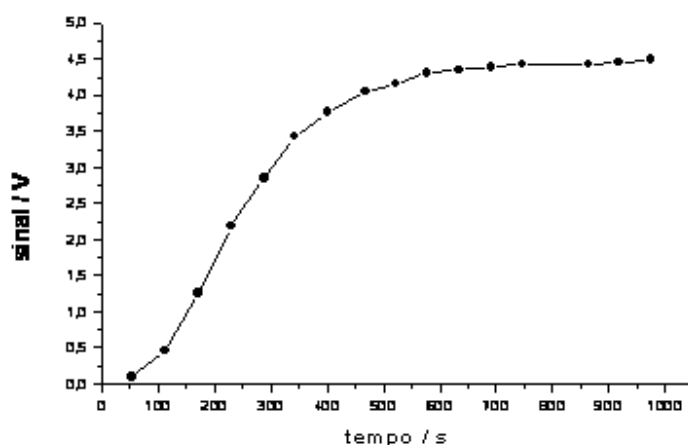


Figura 18 – Evolução da acumulação de metilamina no interior do recipiente em função do tempo

A avaliação da capacidade de acumulação do analito gasoso neste sistema pode ser observado na figura 19, em que se percebe a variação do sinal obtido (todos efetuados após o sistema atingir concentração constante em metilamina) em função da variação dos tempos de acumulação.

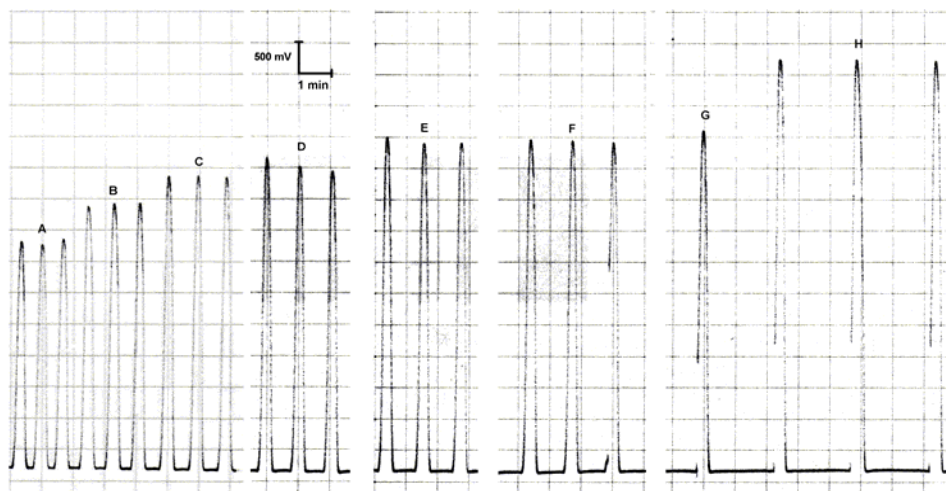


Figura 19 – Diagramas para tempos crescentes de acumulação de metilamina. A – 30 s, B – 45 s, C – 60 s, D – 75 s, E – 90 s, F – 105 s, G – 120 s e H – 240 s.

Os tempos de acumulação utilizados variaram entre 30 s e 4 min, e as medidas foram feitas em triplicata (com exceção de medida única em 2 min). Pode-se observar aumento do sinal analítico com o aumento dos tempos de extração, indicando a possibilidade de sua utilização para pré-concentração de analitos voláteis. A figura 20 resume o comportamento das alturas médias de pico em função da variação dos tempos de extração, que parecem aumentar, tendendo a um limite máximo de saturação para tempo de extração muito longos.

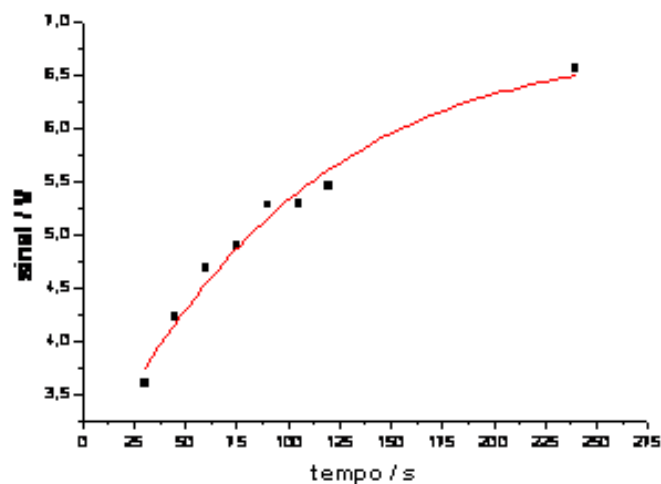


Figura 20 – Variação do sinal analítico em função dos tempos de acumulação de metilamina em água. A tabela ao lado indica os valores médios.

4.3.3 – Determinação de aminas voláteis com cela de extração gasosa e CE-C4D

O dispositivo de extração, já ilustrado na figura 15, é constituído basicamente de um pote de acrílico (A), cuja tampa (B) foi furada e adaptada para permitir o posicionamento do filamento de Oxyphan, (C) enrolado no interior da tampa e apoiado sobre algumas aletas de P.E. (D) permitindo sua fixação. Nas extremidades do filamento de Oxyphan foram colocadas conexões similares às descritas (E), fixadas na tampa do recipiente sob pressão por meio de um septo de borracha.

Em um recipiente (G) situado no fundo do pote, com agitador magnético é introduzida a amostra. Reagentes podem ser adicionados por meio um tubo de polietileno (H) que atravessa a tampa. Há também na tampa uma agulha de injeção (I) com d.i. \cong 0,3 mm, que pode ser fechada com um septo ou aberta para equilibrar a pressão interna do frasco com a externa.

A cela de extração gasosa descrita na figura 15 foi acoplada a uma bomba peristáltica, como demonstrado na figura 21, para propulsão do fluido extrator. O efluente do extrator gasoso foi coletado ao final do sistema em um *vial* e introduzido no equipamento de eletroforese capilar para subsequente análise. Utilizou-se 1,0 metro de comprimento do filamento de Oxyphan na bobina do extrator, o que permite dizer que o volume de solução extratora para o qual é feita a acumulação gasosa é de aproximadamente 62 μ L

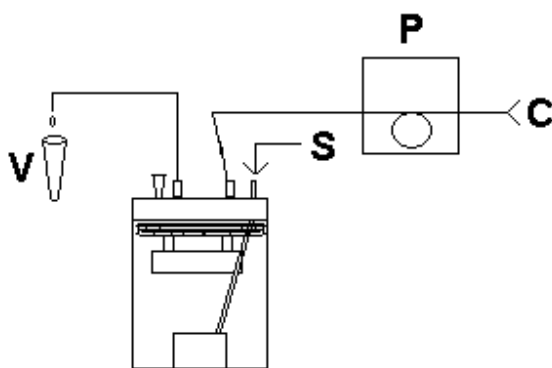


Figura 21 – Sistema FIA utilizado para extração gás-líquido: C – fluido transportador (H₂O deionizada), P – bomba peristáltica, S – entrada de amostra/reagente, V – vial de coleta.

Foram preparados 5 mL de solução contendo metilamina, dimetilamina, trimetilamina, dietilamina e trietilamina, na concentração final de 1 mmol L⁻¹ cada. Durante o preparo da solução foi adicionado HCl até uma concentração final de 0,1 mol L⁻¹, para protonação das aminas e minimização da perda das mesmas por volatilização até o início do experimento.

O processo de acumulação e coleta dos analitos voláteis para determinação por *CE-C4D* foi efetuado manualmente, com controle do tempo pelo próprio operador. O fluido extrator utilizado foi água deionizada.

Durante a etapa de extração gasosa a bomba peristáltica foi desligada, para que o processo de difusão do analito gasoso no interior da câmara e através do filamento de Oxyphan provocasse a sua acumulação na parcela de solução extratora contida no interior do filamento. Em seguida, a parcela de solução extratora foi coletada em um *vial* de polietileno ligando-se novamente a bomba peristáltica. A coleta de solução extratora foi efetuada durante 1 minuto (aproximadamente 0,5 mL de solução) e então inserida manualmente no equipamento de eletroforese capilar para análise.

Nestas condições de extração estabelecidas pode-se observar que, estando a amostra acidulada (0,1 mol L⁻¹ de HCl), como seria de esperar, praticamente não se observa sinal para as aminas voláteis, mesmo para elevados tempos de acumulação, como mostrado na figura 22. Exceção pode ser feita a vestígios de íons amônio (a), como pode ser observado nos eletroferogramas apresentados.

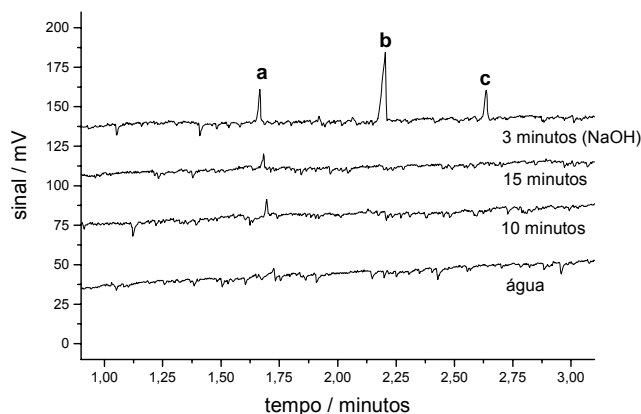


Figura 22 – Eletroferogramas obtidos para corridas efetuadas a –25 kV em tampão MES/histidina, 10/10 mmol L⁻¹, pH 6,0, capilar de sílica de 75µm d.i. (L_{total}=56 cm, L_{efetivo}=50 cm) e injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 30 s. Extrações em tempo variável para mistura de metilamina, dimetilamina, trimetilamina, dietilamina e trietilamina, 1 mmol L⁻¹ cada, antes e após a adição de NaOH. Picos: **a**- NH₄⁺, **b**- trimetilamina, **c**- trietilamina.

Para promover a liberação das aminas gasosas, adiciona-se solução de NaOH para uma concentração final de aproximadamente 1 mol L^{-1} em hidróxido. Após a adição de hidróxido efetuou-se a acumulação de material em tempos crescentes, como pode ser visto na figura 23.

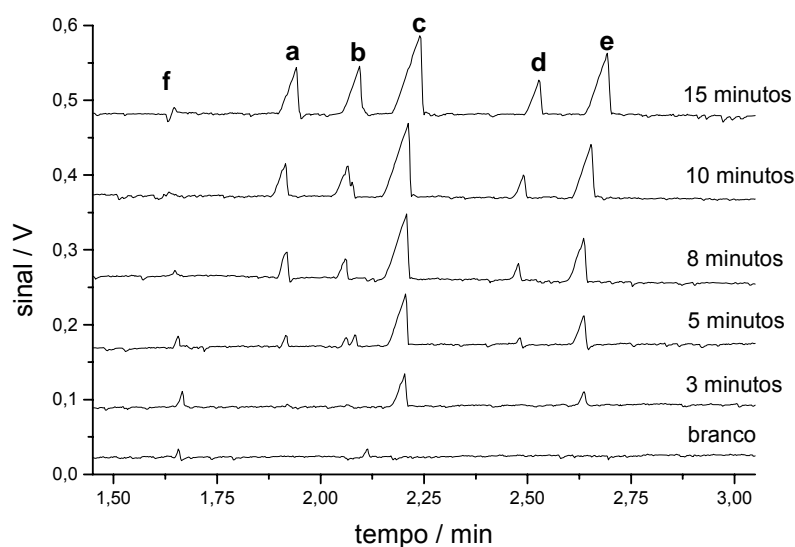


Figura 23 – Eletoferogramas obtidos para corridas efetuadas a -25 kV em tampão MES/histidina, $10/10 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6,0, capilar de sílica de $75 \mu\text{m}$ d.i. ($L_{\text{total}}=56 \text{ cm}$, $L_{\text{efetivo}}=50 \text{ cm}$) e injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 30 s . Extrações em tempo variável para mistura de metilamina (a), dimetilamina (b), trimetilamina (c), dietilamina (d) e trietilamina (e), 1 mmol L^{-1} cada, após a adição de NaOH. Possível contaminação de íons amônio (f).

Os resultados mostrados na figura acima indicam um aumento nos picos das aminas em função do tempo de acumulação, e também que os picos que se manifestam preferencialmente para os tempos de acumulação menores, são aqueles das aminas mais voláteis. Como já estudado anteriormente, para esta geometria e dimensão da câmara extratora, na ausência de convecção, são necessários cerca de

10 minutos para que o meio gasoso em seu interior fique uniforme para metilamina, o que pode justificar uma maior contribuição das espécies mais voláteis em tempos menores.

No procedimento adotado, ao recolher 0,5 mL de solução extratora, ocorre desnecessária diluição do material coletado nos 62 μ L de filamento poroso. O volume morto da câmara também é muito grande. Assim mesmo, os resultados iniciais foram promissores e com algumas modificações visando principalmente a diminuição do volume interno do mesmo (minimização de tempos de homogeneização) e minimização do percurso do extrato gasoso após a etapa de acumulação (minimização de etapa posterior de diluição), espera-se que a sensibilidade e a rapidez do procedimento de coleta possam ser melhoradas. A avaliação da homogeneização do ambiente interno do extrator pode ser monitorada pelo acompanhamento dos sinais obtidos para mesmos períodos de acumulação ao longo do tempo.

4.3.4 – Extração Espécie Voláteis em Peixes Utilizando Cella de Extração Gás-Líquido

A análise de amins de baixo peso molecular em alimentos em geral é considerada de grande interesse no monitoramento do grau de qualidade e decomposição destes, principalmente em carnes, enlatados e peixes. Na determinação destas amins biogênicas em amostras alimentares, a literatura indica diversos métodos analíticos de separação, sendo os cromatográficos os mais bem

estabelecidos [56, 86-88], embora a aplicação da CE neste campo também mereça destaque[54-56, 89].

A complexidade da matriz de amostras alimentares, por vezes aliada à baixa concentração do analito de interesse, via de regra, impossibilitam a introdução direta nos sistemas de separação, tornando necessário a introdução de etapas prévias de extração ou pré-concentração das espécies. Recorre-se por vezes a extrações em meio ácido[55, 56], extração em ponto nuvem[88] ou mesmo à pervaporação[54], como forma de eliminar a matriz complexa.

Como descrito no item 4.3.3 desta tese, foi verificado que a cela de extração gás-líquido desenvolvida possibilita a acumulação de espécies voláteis, embora ainda necessite otimização de seus parâmetros, e devido à sua disposição, permite fácil adaptação para a análise por pervaporação, pela simples introdução da mesma em banho termostatizado. Desta forma, foi avaliada a extração de aminas voláteis e sua análise para amostra de tecido de peixe.

Amostra de salmão foi obtida no mercado local e transportada sob refrigeração até ser preparada em procedimento semelhante ou descrito por Lange e colaboradores[56]. Aproximadamente 50 g de salmão foram fatiados e triturados em processador de alimentos até completa homogeneização. Aproximadamente 1 g desta pasta homogênea foi pesado e misturado com 5 mL de solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, sendo mantido sob agitação magnética durante 30 minutos. Este material foi transferido para o interior da cela desenvolvida para que se procedesse a extração.

As extrações foram realizadas para tempo de 30 minutos, com (banho termostatizado a 65 °C) ou sem aquecimento e, em cada caso, antes e após a adição de 5 mL de solução NaOH 5mol L⁻¹, sendo seus resultados descritos na figura 24. A fase aceptora utilizada foi solução 30 μmol L⁻¹ de Li⁺, mantida em repouso durante a extração e recolhida em vial com auxílio de bomba peristáltica após a coleta (para um volume total de aproximadamente 150 μL).

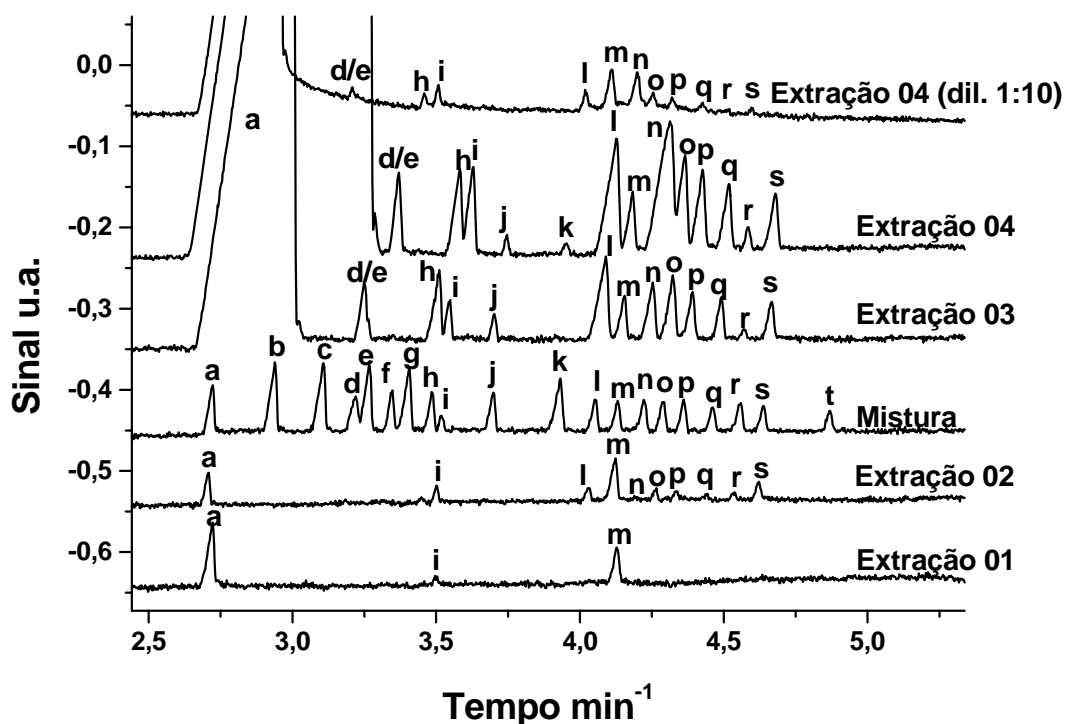


Figura 24 – Extrações gás-líquido de amostra de Salmão. **Extração 1:** sem adição de NaOH, sem aquecimento; **Extração 2:** sem adição de NaOH, com aquecimento (65°C); **Extração 3:** com adição de NaOH, sem aquecimento; **Extração 4:** com adição de NaOH, com aquecimento (65°C). **Mistura:** solução 30 μmol L⁻¹ de NH₄⁺ (a); 1,3-DAP (b), 1,4-DAB (c); MMA(d); 1,5-DAP(e); 1,6-DAH (g); DMA(h); TMA(j); EtolA(k); PA(l); Li⁺(m); DMAE(n); NBA(o); SBA(p); TBA(q); diEtolA(r); HA(s); triEtolA(t). Condições da extração: Fluido Aceptor – solução de Li⁺ 30 μmol L⁻¹, tempo de extração – 30 minutos. (f) e (i) – picos desconhecidos.

Os eletroferogramas na figura 24 permitem observar que com aquecimento, mesmo sem adição de NaOH é possível realizar a coleta das espécies voláteis, como se observa ao comparar a extrações 1 e 2, embora a extração seja bastante intensificada pela adição do reagente. Ainda, o aquecimento da solução leva a um aumento significativo na extração e pré-concentração das aminas na fase aceptora, como observado pelo significativo aumento de sinal entre as extrações 3 e 4. Apesar da grande quantidade de amônia liberada (pico a) e do deslocamento provocado nos tempos de migração dos demais analitos, ainda é possível se tentar uma identificação dos mesmos, quando comparados a uma corrida dos padrões de aminas (Mistura).

Cabe ressaltar, entretanto, que um procedimento analítico mais completo deveria ser utilizado (como, por exemplo, acoplamento a MS) para identificação inequívoca das espécies para cada novo tipo de amostra. Apesar disto, os resultados mostram ser promissora a cela construída como uma forma de realizar a extração de espécies voláteis em amostras reais, como a estudada, bem como para a realização de pervaporação. Versão de dimensões reduzidas é cabível como aperfeiçoamento.

4.3.5 – Construção da Célula Microvolumétrica de Extração Líquido-Líquido

Foi construída também célula para extração líquido-líquido recorrendo a um filamento concêntrico de Oxyphan, acondicionado no interior de um capilar de sílica de 530 μm de diâmetro interno. O capilar de sílica é especificamente interessante por ser

impermeável à difusão gasosa. A célula construída, indicada na figura 25, possui comprimento útil de 20 cm, com volume interno de receptor de aproximadamente 12,5 μL e volume de doador de cerca de 21,5 μL .

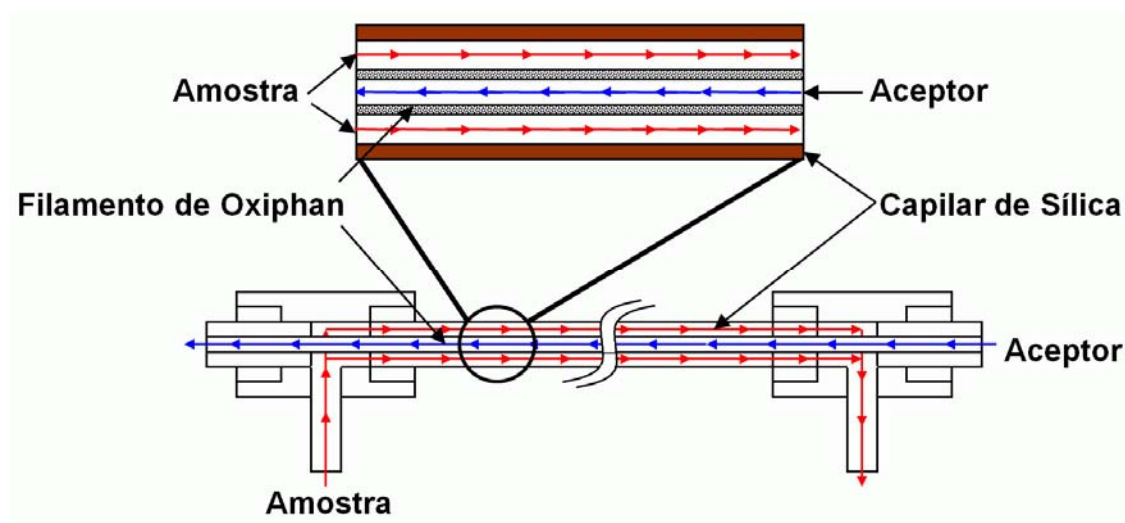


Figura 25 – Célula microvolumétrica para extração líquido-líquido constituída de filamento oco de Oxyphan concêntrico a capilar de sílica.

4.3.6 – Sistema HFME-FIA-CE-C4D

Considerando-se a potencialidade da aplicação do C4D em determinações em FIA, bem como a versatilidade do sistema de HFME desenvolvido, ilustrado na figura 25, foi implementado sistema FIA-CE, utilizando microbombas solenóide para propulsão do fluido e válvulas solenóide de três vias ou de estrangulamento para definição do percurso analítico. O sistema foi controlado por interface USB (USB-6009, National

Instruments) através de programa desenvolvido em LabView (National Instruments, v 8.0). Foto do sistema construído pode ser observada na figura 26.

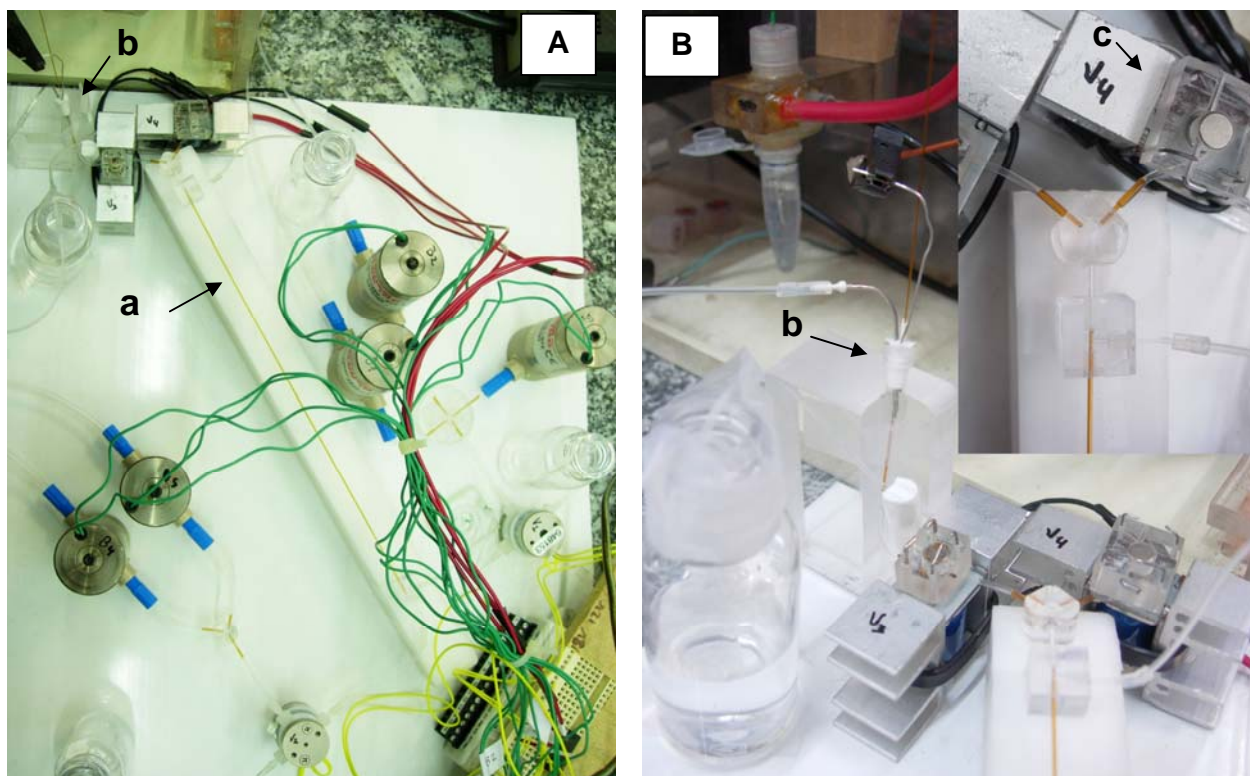


Figura 26 – Foto do sistema HFME-FIA-CE-C4D desenvolvido, com extrator de filamento concêntrico de Oxyphan (a). **A**- vista geral do sistema, **B**- vista da interface FIA-CE (b), detalhe: confluência prévia à injeção no sistema CE e válvula de estrangulamento V4 (c).

Para o acoplamento FIA-CE, foi construída interface em que a ponta do capilar é introduzida numa ponteira de pipeta que, por ser cônica, apresenta pequeno volume morto na extremidade, que é conectada ao circuito FIA. O uso da ponteira descartável de pipetador foi anteriormente proposto por Fang e colaboradores[90]. Conforme ilustrado nas figuras 26 e 27, o lado de maior diâmetro da ponteira foi fechado com septo de silicone perspassado pelo capilar da CE, pelo fio de platina que atua como eletrodo aterrado do equipamento de CE e pela agulha para purga da solução.

Minimizou-se o volume do percurso entre a HFME e a CE (detalhe na figura 26B), aproximando as unidades, conectando-as com tubos finos e utilizando válvulas de estrangulamento, de menor volume morto que as válvulas de 3 vias. A válvula de estrangulamento (esquematisadas na figura 27 e em detalhe na figura 26B) consiste de solenóide que, quando acionado, atrai eixo metálico, estrangulando tubo de silicone e impedindo a passagem de líquido. Estas válvulas foram desenvolvidas por colaboradores do orientador desta tese para aplicação em microestruturas, não tendo ainda sido publicadas, mas correspondem a uma miniaturização de outra válvula de estrangulamento já desenvolvida no grupo[25].

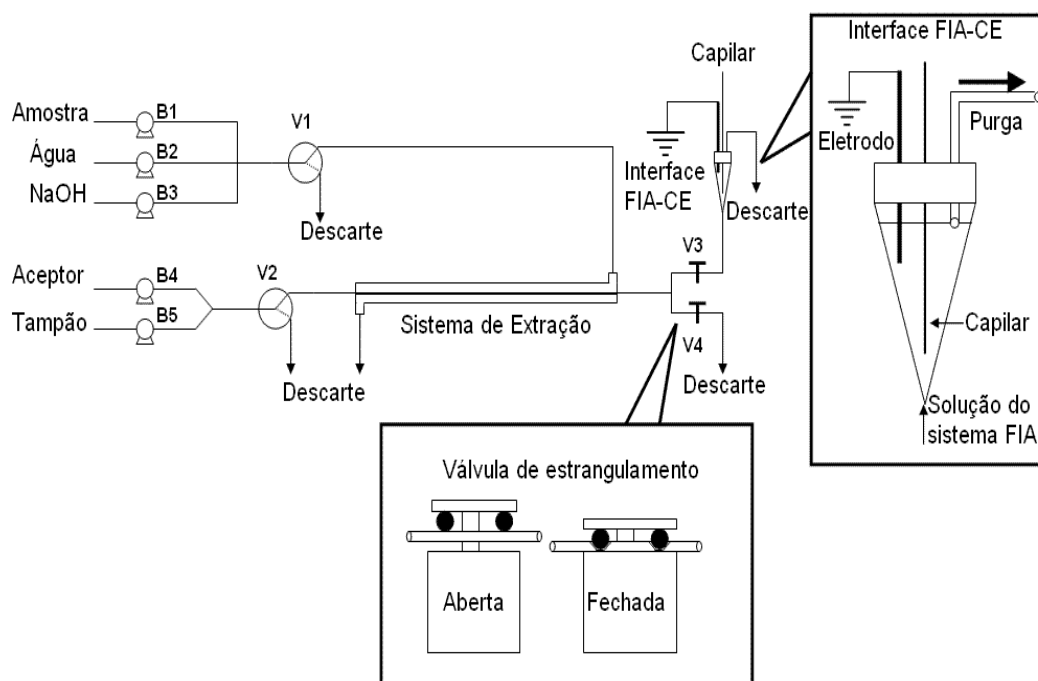


Figura 27 – Esquema do sistema FIA-CE utilizando célula de extração microvolumétrica com filamento de Oxyphan. B1 a B5 – microbombas de 10 μ L, V1 e V2 – válvulas solenóide de 3 vias, V4 e V5 – válvulas solenóide de estrangulamento.

Segundo indicações do fabricante, as microbombas são capazes de funcionar em atividade máxima com um ciclo de acionamento e repouso de 250 ms, tendo sido utilizados ciclos de 300 ms neste trabalho. O programa computacional desenvolvido permite bastante flexibilidade, como o acionamento individual ou simultâneo das válvulas e bombas utilizadas, número de pulsos e tempo de acionamento e espera das microbombas.

O protocolo de análise do sistema HFME-FIA-CE-C4D implementado, encontra-se esquematizado na tabela 10, na qual é indicado quais dispositivos foram acionados em cada etapa, e foi desenvolvido considerando-se três momentos: 1 - Inicial, que considera o preenchimento das bombas e do percurso analítico (etapas 01 e 02), 2 - Análise, para as etapas de extração, injeção da amostra no sistema CE e análise (etapas 03 a 10), 3 - Limpeza, necessária para acondicionar o sistema para a próxima análise (etapas 11 a 13).

Tabela 10 – Esquema do processo de análise utilizado no sistema HFME-FIA-CE-C4D. **V1 - V4** – válvulas solenóide, **X** indica válvula acionada; **B1 - B5** – microbombas de 10 μ L, números indicam quantidade de pulsos aplicados (ativação 300 ms e repouso 300 ms), salvo M e N, que são variáveis, vide texto.

Etapa	Processo	V1	V2	V3	V4	B1 Amos-tra	B2 H ₂ O	B3 NaOH	B4 accep-tor	B5 tam-pão CE
01	Preenchimento das Bombas	X	X			100	100	100	100	100
02	Preenche Sistema de Extração						30			
03	Preenche Sistema CE				X					30
04	Preenche Aceptor no extrator			X					30	
05*	Extração					N		N		
06*	Encerra Extração						30			
07	Prepara Injeção CE				X					M
08 [#]	Injeção CE									
09	Prepara separação CE				X					30
10 [#]	Separação CE			X						
11	Limpeza da Extração Anterior			X			30			30
12 ^{††}	Troca de Amostra	X				50				20
13 ^{††}	Limpeza do Percurso	X					30			

* - os pulsos aplicados nas bombas foram alterados para ativação de 300 ms e repouso variável; [#] - acionamento do equipamento de CE foi manual, mas pode ser automatizado; ^{††} - etapas utilizadas apenas quando necessário. Ao término da etapa 13, retorna-se à etapa 3 para continuidade da análise.

Segundo o esquema apresentado na tabela 10, as etapas de condicionamento do sistema de análise, extração e limpeza são controladas pelo programa computacional, afóra o disparo do equipamento CE feito pelo operador. Ressalta-se, porém, que devido à flexibilidade do sistema proposto, tal automatização poderia ser facilmente implementada para aplicações de rotina.

A interface desenvolvida permite o acoplamento direto a equipamento de CE-C4D desenvolvido neste grupo de pesquisa, já anteriormente descrito[27]. Nesta montagem, a introdução da amostra no interior do capilar, para análise por eletroforese,

se dá com o fluxo do sistema FIA em repouso (etapa 08). A injeção da amostra na CE se dá por pressão negativa, sendo que fluxo de tampão de corrida é acionado para limpeza do acoplador (etapa 09) e novamente interrompido durante a realização da análise (etapa 10). Ressalta-se, também, que, como indicado na figura 27, o eletrodo introduzido na interface FIA-CE é o terra.

Na etapa de extração (etapas 5 e 6 da tabela 10) , visando ao aumento do sinal analítico das espécies acumuladas, variou-se, além do número de pulsos da microbomba, o tempo de repouso após cada pulso. Desta forma, o tempo de residência da amostra no sistema foi ampliado, sem haver maior consumo de amostra.

Etapa crítica para a aplicação dos sistemas FIA-CE, como já destacado neste trabalho, reside na transferência de pequenos volumes de solução do sistema FIA ao sistema CE. A repetibilidade dos volumes, bem como o perfeito sincronismo entre a zona de amostra, proveniente do sistema em fluxo, a ser introduzida no sistema de análise, constitui uma das etapas-chave para o sucesso do acoplamento entre as duas técnicas.

Com o intuito de avaliar o sistema de HFME-FIA-CE-C4D proposto, foi utilizada como amostra padrão uma solução contendo mistura de cloridrato de metilamina, cloridrato de dimetilamina e cloridrato de trimetilamina, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada, e solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH como reagente para desprotonação das aminas, facilitando a volatilização, e solução $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LiCl como solução aceptora. As separações em eletroforese capilar foram efetuadas a 20 kV, utilizando-se capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, com 60 cm de comprimento total e 50 cm de comprimento efetivo, em tampão MES/histidina, 20/20 mmol L^{-1} , com 40 s de injeção hidrodinâmica

de 10 cm de coluna d'água. Conforme indicado na figura 28, o número de acionamentos da microbomba B5 para a transferência do fluido acceptor para a interface com o sistema CE (etapa 7 da Tabela 10) foi variado, com o registro dos eletroferogramas subseqüentes, com o intuito de se determinar experimentalmente a condição ótima de transferência da amostra ao capilar. O número de pulsos das microbombas (300 ms de acionamento e 5,0 s de repouso) de propulsão do fluxo doador foi $N = 55$ durante a extração (etapas 5 e 6 da tabela 10), resultando em um tempo de residência da amostra no sistema de aproximadamente 4,8 minutos.

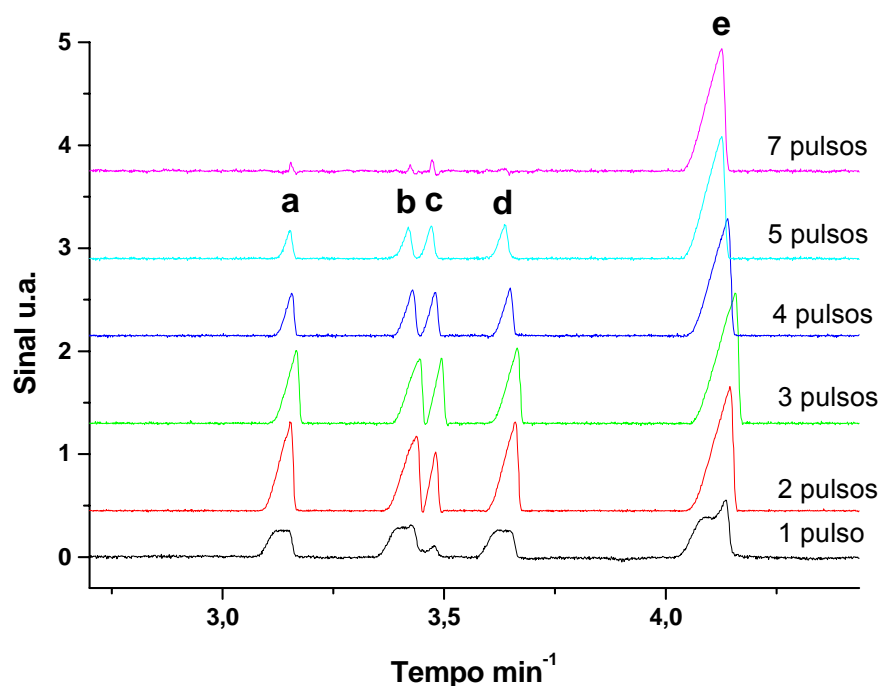


Figura 28 – Determinação empírica do número de pulsos para deslocar a amostra do microextrator até o ponto de injeção da amostra no capilar. **A** - metilamina, **b** - dimetilamina, **c** - pico desconhecido (sódio?), **d** - trimetilamina, **e** - lítio.

Como indicado na figura acima, um pulso é insuficiente para deslocar o plugue de amostra extraída até o capilar; com 2 pulsos os picos apresentam ótima definição e altura ligeiramente maior que com 3 ou mais pulsos. Com 7 pulsos, restam apenas vestígios da amostra, o que indica que não há efeito de memória, facilitando a lavagem entre uma análise e outra. Tais resultados se mostram condizentes com o esperado para o perfil de distribuição de concentrações na zona de amostra, como decorrência da dispersão no percurso FIA, sendo o perfil mais alongado na região de cauda.

Frente aos resultados obtidos, é possível perceber que 2 ou 3 pulsos podem ser satisfatoriamente utilizados na etapa de transferência do fluido aceptor do sistema de HFME ao capilar para a separação eletroforética, mantendo a maior faixa de concentração da mesma. Foi adotado **M** igual a dois pulsos, na etapa 7 indicada na tabela 10.

A utilização de micro-bombas solenóide é, pois, muito conveniente para estabelecer o sincronismo necessário, vez que se controla exatamente, a partir da programação, cada pulso de volume definido de fluido. Ao utilizar bombas peristálticas – usuais em sistemas FIA – não se tem o mesmo controle das vazões (os tubos da bomba se deformam gradualmente com o uso) nem, tampouco, facilidade de realizar paradas súbitas. Daí a necessidade de monitorar a movimentação do plugue de amostra extraída por técnica auxiliar como a C4D, possibilidade demonstrada no item 4.1, na época em que ainda não se dispunha de bombas-solenóide no laboratório e deixada de lado com a chegada destas. De qualquer forma, a presença de um C4D junto ao ponto em que a amostra é admitida pelo capilar é interessante para propiciar o sincronismo de sistemas FIA-CE-C4D em geral, propelidos por bomba peristáltica, por

aplicação de diferença de pressão, ou mesmo por bombas solenóide, quando se quer evitar a localização empírica do ponto ótimo de injeção após mudanças no sistema FIA, como, por exemplo, tipo, posicionamento e dimensões do extrator, diâmetro ou comprimento dos tubos de conexão, intercalação de bobinas de reação, dentre outras.

A eficiência do acoplamento HFME-FIA-CE-C4D foi avaliada utilizando-se as mesmas soluções aceptora e doadora indicadas anteriormente. O número de pulsos das microbombas 1, 2 e 3 (etapas 5 e 6 da tabela 10) utilizado para impulsionar o fluxo doador durante a extração foi variado entre 55 e 165 pulsos (figura 29), para um tempo de acionamento das mesmas de 300 ms e repouso de 5,0 s, resultando em tempos de permanência da amostra no sistema, respectivamente, de 4,8 e 14,6 minutos, e um consumo de amostra da ordem de 550 μL e 1,65 mL.

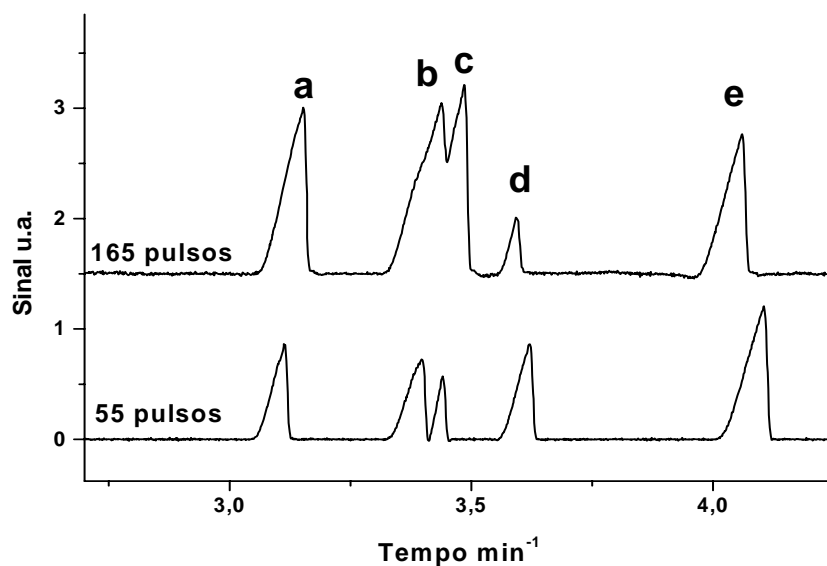


Figura 29 – Variação do número de pulsos de fluxo doador, com a fase aceptora imóvel, durante a extração no sistema FIA-CE. a - metilamina, b - dimetilamina, c - pico desconhecido, d - trimetilamina, e- lítio.

Como pode ser observado, há um aumento no sinal analítico de MMA (**a**) e DMA (**b**), com o aumento do tempo de coleta, mantendo-se a magnitude do pico do padrão interno (**e**) presente na solução acceptora. Embora haja aumento dos sinais, não se observa a relação linear das áreas com o tempo de extração (três vezes o valor). Também se observa, ao contrário do que se esperaria à primeira vista, diminuição do sinal da TMA (**d**), a mais volátil das aminas estudadas. Possível explicação para este comportamento pode estar na utilização de solução aquosa não-tamponada na coleta das aminas, levando a um aumento de pH abrupto quando da dissolução e protonação das espécies, ao menos na interface gás-líquido, com lenta propagação difusional para o interior do filamento. Tal elevação local de pH dificultaria a absorção das espécies gasosas na fase líquida, sendo mais intensificada no caso das espécies mais voláteis (TMA: $k_H = 9,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$, MMA: $k_H = 90 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$, DMA = $57 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$)[91]. Estudos futuros com solução acceptora tamponada deverão auxiliar na elucidação deste comportamento.

Os resultados obtidos, embora exploratórios, permitem lançar as bases para o acoplamento HFME-FIA-CE-C4D, através do sistema proposto, restando ainda a possibilidade da automatização total do mesmo pela introdução de segundo C4D e modificações de software necessárias, bem como a sistematização e quantificação das espécies voláteis até agora estudadas, até o desenvolvimento de métodos analíticos completos.

4.4 – Pré-concentração eletroquímica de íons metálicos e determinação por CE-C4D

4.4.1 – Determinação de cátions metálicos em CE-C4D

A determinação de traços de íons metálicos apresenta grande interesse em química analítica seja para o monitoramento de processos e efluentes industriais ou análise de contaminação em solos e águas. Técnicas eletroquímicas são bastante empregadas na determinação de íons metálicos, principalmente as voltametrias com pré-concentração do analito no próprio eletrodo de trabalho, como as de redissolução anódica, *ASV (anodic stripping voltammetry)* ou catódica, *CSV*. Em comparação com as técnicas baseadas em espectroscopia de emissão ou absorção atômica, largamente utilizadas, de maneira geral, a *ASV* e a *CSV* tem a seu favor o uso de equipamento de custo muito menor, mais simples, compacto, operado à temperatura ambiente (sem forno, chama ou plasma) e a não interferência de eletrólitos inertes (p.ex., NaCl), apresentam sensibilidade similar, mas tem seletividade menor, se bem que adequada para inúmeras aplicações relevantes, inclusive, análise de traços de metais tóxicos.

Trabalhos da literatura também descrevem a separação e determinação de íons metálicos utilizando eletroforese capilar, inclusive com detecção condutométrica sem contato. Os problemas encontrados com a CE-C4D incluem a sensibilidade limitada (da ordem de $10^{-5} \text{ molL}^{-1}$), satisfatória para muitas aplicações em que se visa, p.ex., os metais alcalinos e alcalino-terrosos, mas insuficiente para traços de metais (e semi-metais) tóxicos, prejudicados adicionalmente pela interferências de íons de metais

alcalinos e alcalino-terrosos, usualmente presentes em concentrações muito maiores, tornando inviável, por exemplo, a aplicação direta do método a amostras reais que possuam grande teor salino (problemáticas também na espectroscopia atômica).

Desta forma, a proposta de se utilizar uma etapa prévia de tratamento eletroquímico antes da injeção da amostra na eletroforese capilar pode ser bastante atraente, permitindo efetuar troca de matriz, bem como expandir os limites de detecção recorrendo à pré-concentração. Esse acoplamento pode ser especialmente interessante em casos onde, devido ao elevado número de metais presentes na mesma amostra, ou características intrínsecas dos íons metálicos envolvidos na análise (p.ex. formação de compostos intermetálicos), a análise direta por ASV não seja possível ou facilmente executável. Também para situações que demandam troca do eletrólito entre a pré-concentração e a determinação voltamétrica devido a problemas com a matriz original (p.ex. presença de complexantes) mediante operação no modo de análise em fluxo, a adição de estágio CE-C4D merece consideração.

Antes de estudar a pré-concentração dos metais, avaliou-se os que podem ser separados e determinados por CE-C4D, variando os tampões utilizados como eletrólito. Na extensa série de íons metálicos considerada, os dez ressaltados em negrito mostraram comportamento favorável: **Tl(I), Mn(II), Cd(II), Pb(II), Cr(III), Zn(II), Ag(I), Cu(II), Co(II), Ni(II)**, Sn(II), Sb(III), Hg(II), Bi(III), Au(III), Pd(II) e Fe(III). Ressalte-se que para os íons Ag^+ , o sinal foi fraco.

Já foi mencionado na parte experimental que as soluções dos íons metálicos foram preparadas a partir de soluções padrão dos metais (Merck ou Sigma) ou a partir dos sais PA (Sigma, Aldrich) de cloreto ou nitrato dos respectivos metais. Além de tampões indicados na literatura, alguns outros foram testados, assim como a influência da adição de alguns agentes complexantes. Os resultados foram reunidos na figura 30.

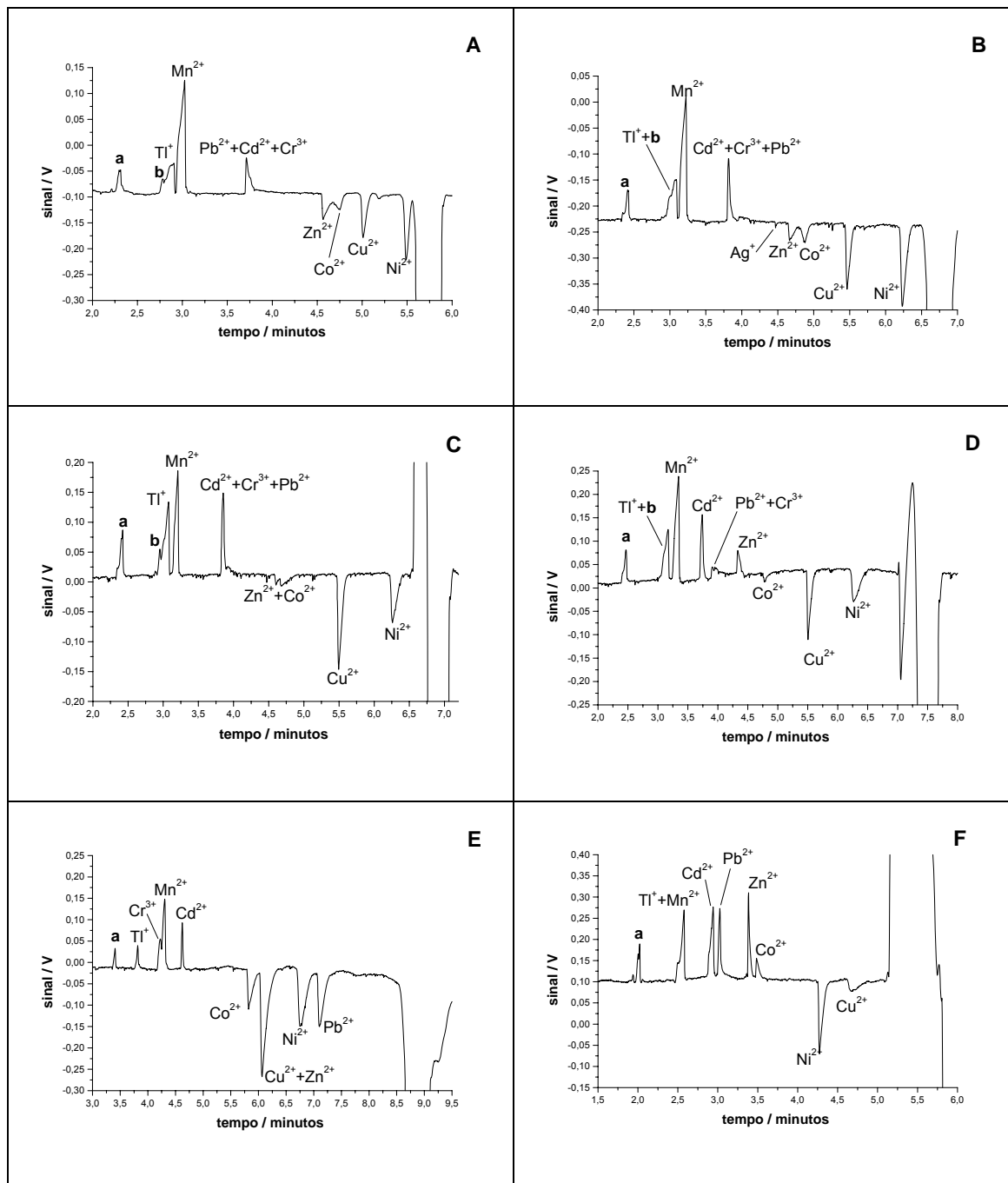


Figura 30 – Avaliação de alguns tampões para determinação de íons metálicos por eletroforese capilar. Condições experimentais: potencial de separação, 25kV, capilar de sílica de 75 μm d.i. ($L_{\text{total}}=56$ cm, $L_{\text{efetivo}}=50$ cm) e injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 30 s. Amostra contendo mistura de cátions TI^+ , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} , 10 ppm de cada, mais Mn^{2+} (5 ppm) e Pb^{2+} e Ag^+ (20 ppm). Tampões estudados: A - MES/histidina, 10/10 mmol L^{-1} , pH 5,9; B - MES/histidina, 10/10 mmol L^{-1} , pH 5,5, acertado com HAc 4%(v/v); C - histidina/ácido acético, solução 10 mmol L^{-1} em histidina, pH 5,5, acertado com HAc 4%(v/v); D - histidina/ácido acético (como C) + 2mM ácido láctico; E - histidina/ácido acético (como C) + 2mM ácido málico, F - histidina/ácido láctico, (10/10 mmol L^{-1}), pH 5,3, potencial de separação aplicada 20kV. Picos a e b: desconhecidos

Pode-se observar várias particularidades nas separações dos íons metálicos nos tampões estudados, provavelmente devido a efeitos de complexação entre estes íons e os aditivos adicionados. Principalmente observa-se que a maioria dos tampões não foi capaz de separar os picos de Pb^{2+} e Cr^{3+} , estando algumas vezes inclusive o Cd^{2+} sobreposto. Somente se conseguiu separar estes três picos nos tampões E e F, considerados, pois, os tampões mais interessantes, por permitirem uma boa separação da maioria dos cátions de interesse.

Considerando como ponto de referência os sinais obtidos para os metais em tampão MES/histidina (tampão A), pode-se dizer que a adição de ácido málico contribui para uma boa separação entre Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cr^{3+} , permitindo migração bem mais rápida para os íons cromo(III) e atrasando bastante os íons chumbo(II), fazendo com que este passe a ser determinado indiretamente (pico negativo), mas com um grande ganho em sensibilidade para o mesmo. No entanto, a adição de ácido málico levou à co-migração entre zinco(II) e cobre(II), que são analitos de grande interesse neste trabalho.

A presença de ácido láctico no tampão promoveu uma inversão no sinal dos íons Zn^{2+} , diminuindo seu tempo de migração e levando-os a serem determinados diretamente, porém causou uma grande diminuição no sinal dos íons Cu^{2+} , notadamente no tampão F, na ausência de ácido acético.

4.4.2 – Comportamento eletroquímico e pré-concentração de alguns cátions metálicos

Para os cátions que se mostraram dentro do limite de detecção por CE-C4D dentro das condições experimentais estudadas, a saber, Tl(I), Mn(II), Cd(II), Pb(II), Cr(III), Zn(II), Ag(I), Cu(II), Co(II) e Ni(II), foram realizados estudos eletroquímicos para verificar quais dentre eles poderiam ser reduzidos e reoxidados sobre eletrodo de ouro, de modo a possibilitar sua pré-concentração e troca de matriz antes da injeção no equipamento de eletroforese capilar.

Os ensaios foram feitos utilizando-se eletrodo de ouro obtido a partir de CDs graváveis com superfície de ouro, conforme indicado por Angnes e colaboradores[92]. Estes eletrodos, constituídos de fino filme de ouro sobre base de policarbonato, são planos, podem ser facilmente cortados, dispensam pré-tratamento trabalhoso e podem, eventualmente, ser descartados após o uso, dado o seu baixo custo.

A alternativa de utilizar estes CDs na confecção de eletrodos de ouro planos de boa homogeneidade de superfície já vem sendo amplamente utilizada pelo grupo, inclusive na construção de celas para utilização em fluxo. Os testes eletroquímicos foram efetuados usando-se uma cela para análise em fluxo do tipo flow-through, bastante semelhante à que será descrita posteriormente para se efetuar a pré-concentração eletroquímica em fluxo acoplada à eletroforese capilar, salvo a ausência de conexão para introdução do capilar de sílica. A célula foi acoplada a um

potenciostato Autolab, da Echo-Chemie, controlado por microcomputador. A montagem experimental utilizada é esquematizada na figura 31.

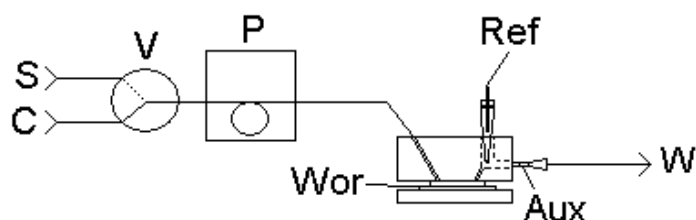


Figura 31 – Sistema em fluxo utilizado para ensaios eletroquímicos. C – fluido transportador (tampão), S – amostra, V – válvula, P – bomba peristáltica, W – descarte, Wor – CDtrodo de ouro, Ref – eletrodo de referência, Aux – eletrodo auxiliar. Os três eletrodos estão conectados ao potenciostato.

Devido à intenção inicial de realizar as etapas de deposição e redissolução eletroquímicas em um tampão compatível com a subsequente análise por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato, optou-se por iniciar os estudos utilizando-se tampão HAc/Ac⁻, 20/20 mmol L⁻¹. Os resultados dos estudos de ASV com onda quadrada podem ser observados na figura 32.

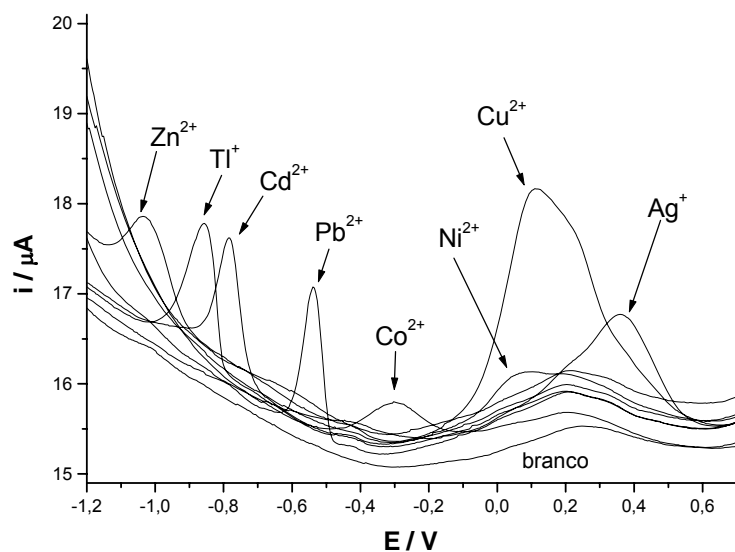


Figura 32 – Ensaio eletroquímico ASV - onda quadrada. Tampão HAc/Ac⁻ 50/50 mmol L⁻¹. Deposição -1,6V por 40s de passagem de amostra a uma vazão de 1,5 mL min. Parâmetros de onda quadrada: degrau 0,004V, amplitude 0,04V. Soluções de 1 ppm de cada cátion metálico.

Pode-se observar pelos voltamogramas que, dos (semi-)metais adicionados, não se observou sinal para Mn(II) e Cr(III) nas condições especificadas, ou seja, o demais cátions metálicos podem reduzidos e reoxidados em meio de tampão acetato sobre eletrodo de ouro, indicando que, em maior ou menor escala, seja possível realizar a pré-concentração e/ou troca de matriz para Tl(I), Cd(II), Pb(II), Cr(III), Zn(II), Ag(I), Cu(II), Co(II) e Ni(II).

A utilização de tampão acetato para separação em CE-C4D é satisfatória para demonstrar o funcionamento da célula de pré-concentração eletroquímica acoplada a FIA-CE no caso de soluções envolvendo íons Cu(II), mas apresenta inconvenientes indesejáveis para CE, como elevada mobilidade do cátion utilizado na preparação do tampão (usualmente sódio ou potássio), o que obriga a recorrer à detecção indireta da

maioria dos cátions, além de apresentar um baixo poder de resolução para os cátions metálicos estudados. Torna-se, pois, bastante desejável a substituição deste tampão como tampão de corrida, vez que como mostrado na figura 30, há alternativas mais eficientes para os analitos de interesse.

Optou-se por tratar inicialmente um número mais reduzido de analitos, Cu(II), Zn(II), Pb(II) e Cd(II), já amplamente estudados eletroquimicamente, isoladamente ou em conjunto, e avaliar seu comportamento frente a redissolução em meio do tampão de corrida da eletroforese capilar. Vez que estes quatro cátions podem ser adequadamente separados em tampão MES/histidina, esse foi o tampão escolhido, e o resultado do teste eletroquímico é apresentado na figura 33.

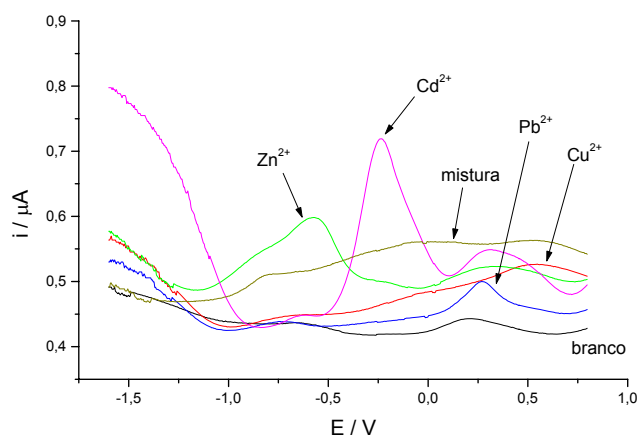


Figura 33 – Ensaio eletroquímico ASV-onda quadrada. Tampão de deposição HAc/Ac⁻ 20/20 mmol L⁻¹. Deposição -1,6V por 40s de passagem de amostra a uma vazão de 1,5 mL min. Parâmetros de onda quadrada: degrau 0,004V, amplitude 0,04V. Soluções de 1 ppm de cada cátion metálico. Redissolução em tampão MES/histidina 10/10 mmol L⁻¹ (tampão de corrida para CE).

Pode-se observar que é possível fazer a deposição dos íons metálicos em tampão ácido acético/acetato 20/20 mmol L⁻¹, e, em seguida, a redissolução dos metais em tampão MES/histidina 10/10 mmol L⁻¹, embora resulte em sinal de corrente muito menos intenso do que quando o mesmo processo é realizado em meio de tampão acetato, um aspecto secundário quando se tem em vista a detecção final condutométrica.

4.4.3 – Construção de Célula para ECPC em fluxo acoplada a CE-C4D

As células para operação em fluxo para voltametria [92] e espectroeletroquímica [93], anteriormente desenvolvidas pelo grupo com base em eletrodos de ouro obtidos de CD-Rs, serviu de inspiração para planejamento e construção da célula de pré-concentração eletroquímica em fluxo adaptada à introdução da amostra no capilar para análise por CE. A célula que integra pré-concentração eletroquímica e CE é mostrada na figura 34, e foi construída com dois blocos de acrílico (A e B), possuindo um canal (C) para entrada do fluxo do sistema FIA, rumo à superfície de ouro do CD (D), que funciona como eletrodo de trabalho, cuja área é delimitada por um espaçador de borracha (E). No canal de saída (F) encontra-se espaço para a introdução do eletrodo de referência (G) e do eletrodo a ser utilizado como terra na CE (H) bem como o eletrodo auxiliar (I) que é constituído de uma agulha de seringa hipodérmica de aço inoxidável que serve também como escoadouro da solução do percurso FIA para descarte. No centro do bloco superior de acrílico, foi feita uma perfuração (J) em cuja

extremidade inferior se instalou um pedaço de tubo de Tygon® (K) que funciona como septo para o posicionamento, sob pressão, do capilar de sílica (L) da CE impedindo seu deslocamento ou vazamento de solução. Dois parafusos (M) nas extremidades da célula pressionam o espaçador de borracha, garantindo a vedação.

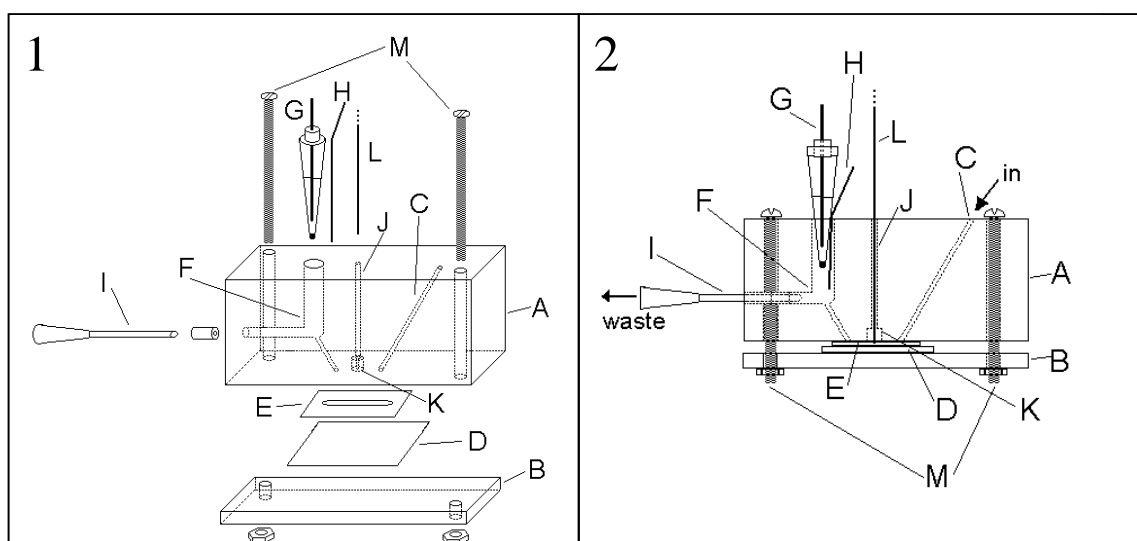


Figura 34 – Célula para pré-concentração eletroquímica em fluxo acoplada a eletroforese capilar, sendo suas vistas explodida (1) e lateral (2), em que, A – bloco superior de acrílico, B – bloco inferior de acrílico, C – canal de entrada, D – CDtrodo de ouro, E – espaçador de borracha, F – canal de saída, G – eletrodo de referência, H – eletrodo terra da CE, I – eletrodo auxiliar, J – canal para entrada do capilar, K – septo de Tygon, L – capilar de sílica fundida, M – parafusos e porcas para fixação.

Devido a problemas provenientes de blindagem da alta tensão no protótipo FIA-CE construído e devido à compatibilidade da utilização de outro equipamento CE presente no laboratório, construído por Fracassi[27], os testes foram efetuados segundo configuração mostrada na figura 35.

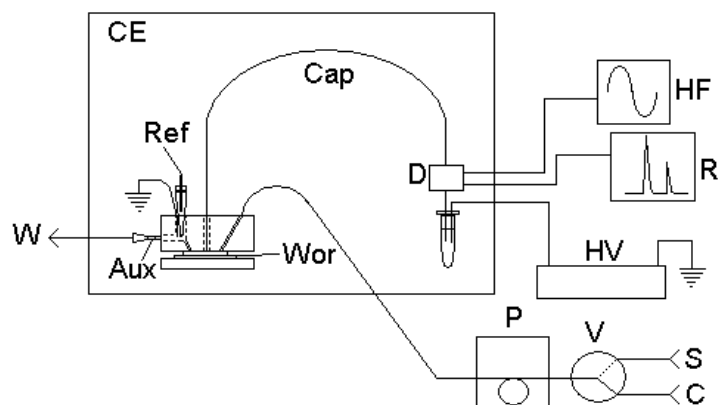


Figura 35 – Sistema ECPC-FIA-CE-C4 utilizado, C – fluido transportador, S – amostra, V – válvula, P – bomba peristáltica, W – descarte, D – detector, Cap – capilar de sílica, Wor – CDtrodo de ouro, Ref – eletrodo de referência, Aux – eletrodo auxiliar, CE – cúpula termostatizada do equipamento CE, HV – fonte de alta tensão, R – registrador, HF – fonte de alta freqüência.

Esta célula, compacta e funcional, serviu perfeitamente aos estudos exploratórios apresentados a seguir para demonstrar o funcionamento do acoplamento ECPC-FIA-CE-C4D. Cabe antecipar, todavia, que a sensibilidade final ainda é prejudicada pelo volume interno alto na região do eletrodo de trabalho frente ao volume que é efetivamente transferido para o capilar (injetado), ou seja, ocorre diluição desnecessária dos analitos. Visando superar também esta limitação, desenvolveu-se um primeiro protótipo de célula microfluídica interfaceada com a CE, descrito a seguir. Todavia os resultados apresentados nos itens finais se referem à célula das figuras 34 e 35.

A célula eletroquímica em fluxo acima descrita (figura 34), bastante compacta, ainda apresenta dimensões internas exageradas para ECPC-FIA-CE. A espessura do espaçador de borracha utilizado (1 mm) e do canal nele cortado (2 mm) determinam as

dimensões internas da célula de pré-concentração. Ao se considerar uma zona de 2 mm do eletrodo de ouro como a região ativa efetiva perto do capilar, um eletrodo de área 4 mm^2 iria redissolver o material depositado em sua superfície num volume de aproximadamente $4 \mu\text{L}$, sendo que nesse volume, a extremidade do capilar estaria posicionada a uma distância entre zero e 1,5 mm da superfície do eletrodo. Todavia, somente alguns nanolitros poderão ser transferidos para o interior do capilar de sílica (d.i.= $75 \mu\text{m}$, d.e.= $350 \mu\text{m}$), ou seja, diluir o material redilssolvido em $4 \mu\text{L}$ acarreta desnecessária perda de sensibilidade na CE. Pode-se diluir menos o material realizando a injeção no capilar antes da homogeneização por difusão. Todavia, é difícil precisar o melhor período após o início da etapa de redissolução para se efetuar a injeção, dada a dificuldade em posicionar o capilar a uma distância precisa e reprodutível da superfície do eletrodo de ouro.

Minimizar a distância entre o capilar e o eletrodo pode causar outro problema, qual seja, dificultar o acesso da solução contendo os analitos ao eletrodo durante o período de deposição, vez que, em volta do capilar, o canal continua com 1 mm de espessura. A alternativa que vem sendo investigada para aliviar esse problema é minimizar também a espessura do canal da célula (espaçador muito mais fino), recorrendo à construção de células microfluídicas utilizando policarbonato, segundo técnica recentemente desenvolvida pelo grupo, utilizando CDs para obtenção de eletrodos coplanares múltiplos e de formato complexos[94]. Para tanto, máscaras de *toner* são impressas a laser sobre papel não aderente e transferidas termicamente para o CD; após corrosão da área não protegida com solução iodo/iodeto, a máscara de *toner* é removida com acetonitrila[94]. Estes eletrodos podem então ser convertidos em

células microfluídicas pela sobreposição, por transferência térmica, de um espaçador, também impresso com *toner*, sobre o qual é aplicado, novamente à quente, a “tampa”, que pode ser de filme de poliéster ou uma secção de um CD de policarbonato (com ou sem eletrodos adicionais).

O esquema das microestruturas construídas é apresentado na figura 36, consistindo basicamente de duas placas de policarbonato seladas com *toner* a quente. A placa inferior (A) consiste de um CD gravável de ouro, sobre o qual é aplicada a máscara de *toner* e aplicada solução de iodo/iodeto, para que se possa obter os eletrodos de ouro desejados na região protegida pelo *toner*, que é posteriormente removido com acetonitrila. Sobre esta placa aplica-se ainda uma segunda máscara de *toner* que determina o percurso fluídico da microestrutura, no caso, compreendendo um canal de 600 μm de largura e 15 mm de comprimento, culminando em uma região mais larga, destinada à configuração de um “poço” (I) destinado introdução do eletrodo de referência e de auxiliar da célula eletroquímica.

Na placa superior de policarbonato (B), obtida mediante a remoção da película protetora e do filme metálico de um CD gravável de prata, é aplicada uma primeira máscara de *toner* que serve como guia para que se sejam feitos os furos de acesso à célula. Em seguida aplica-se uma segunda máscara de *toner*, igual à aplicada sobre a placa contendo os eletrodos, visando a vedação e união das duas chapas de policarbonato (C) pela fusão do *toner* mediante aquecimento em uma prensa térmica.

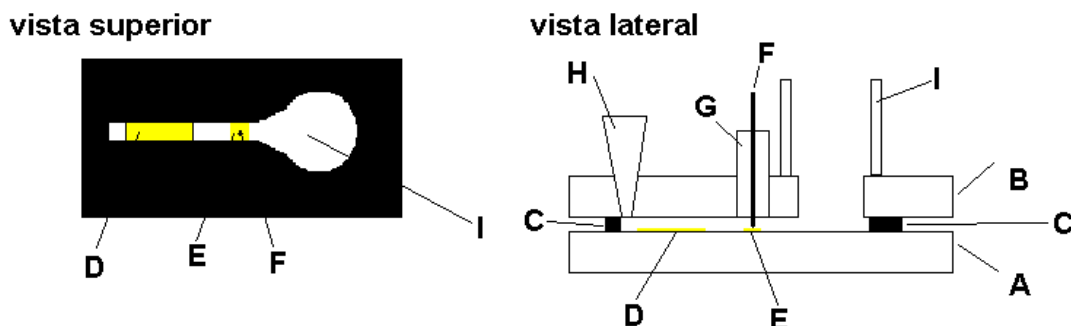


Figura 36 – Esquema ilustrativo da célula microfluídica para ECPC-FIA-CE-C4D desenvolvida. A – chapa inferior de CD gravável, B – chapa superior de policarbonato, C – dupla camada de *toner* (10-12 μm) atuando como vedante e espaçador, D – eletrodo de ouro que atua como terra durante a separação eletroforética, E – eletrodo de ouro que atua como eletrodo de trabalho durante o tratamento eletroquímico da amostra, F – capilar de sílica (d.i.= 75 μm , d.e.= 350 μm), G – tubo de Tygon (guia para fixação do capilar), H – ponteira de pipeta para conexão e entrada da solução do percurso FIA, I – reservatório com tampão para introdução dos eletrodos de referência e auxiliar / saída do sistema FIA. OBS: fora de escala para se favorecer a compreensão.

O canal principal das microestruturas desenvolvidas possui dois eletrodos de ouro em seu percurso, o primeiro (D), com 9,0 mm de comprimento está posicionado bem próximo à entrada da célula e pode atuar como terra para a eletroforese capilar, o segundo (E) possui 1,5 mm de comprimento e está localizado bem debaixo da extremidade do capilar de sílica (F), e constitui o eletrodo de trabalho na célula eletroquímica.

O capilar de sílica é introduzido na microestrutura pelo interior de um tubo de Tygon (G) de diâmetro interno 350 μm que está colado na placa superior da microestrutura e atua como septo, posicionando a saída do capilar bem no centro do eletrodo de trabalho (E). Como no caso da célula para sistema ECPC-FIA-CE-C4D

desenvolvida, para a célula microfluídica, o problema de posicionamento do capilar persiste, porém neste caso as dimensões envolvidas são muito menores. O eletrodo de trabalho possui 600 μm de largura e 1,5 mm de comprimento, ou seja, 0,90 mm^2 de área. A distância resultante da fusão das duas camadas de *toner*, que além de proporcionar a vedação da microestrutura também funciona como espaçador, apresenta entre 10 a 12 μm de altura, ou seja, desprezando-se a difusão radial, na ausência de convecção, o material depositado sobre o eletrodo será redissolvido num volume de aproximadamente 9 nL, da mesma ordem do volume a ser transferido para o capilar. Dessa forma, ao tempo suficiente para que a região ao redor do capilar seja homogeneizada por difusão do material redissolvido, encontrando-se a extremidade do capilar em qualquer ponto dentro desta camada delgada de líquido (desde que não se encontre inteiramente apoiado no eletrodo), a diluição do analito, assim como a sincronização entre a etapa de redissolução e de injeção no capilar passarão a ser menos críticas.

A possibilidade de se poder incluir um dos eletrodos (terra) da eletroforese capilar na própria microestrutura parece uma alternativa bastante interessante devido à praticidade da montagem, no entanto, resíduos de decomposição do tampão ou pequenas bolhas formadas sobre o eletrodo poderiam ser levadas para o interior do capilar, interferindo na análise. Dessa forma, como ilustrado na figura 37, os primeiros testes com as microestruturas consistiram em avaliar a possibilidade de utilização deste eletrodo.

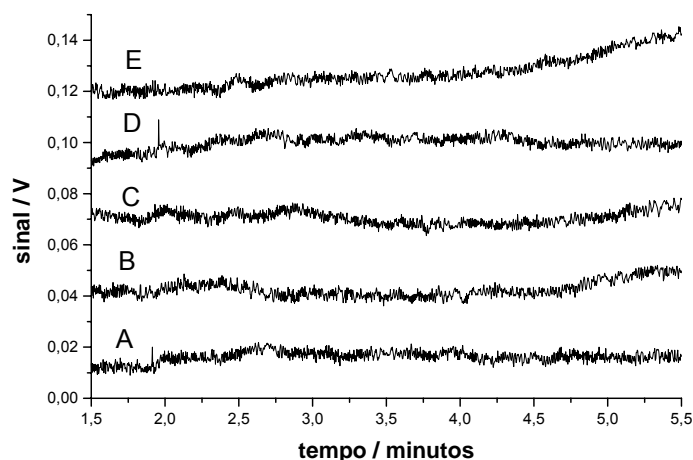


Figura 37– Estabilização do sinal de da linha-base para a célula de ECPC-FIA-CE-C4D. Condições experimentais: potencial de separação: 25 kV, tampão MES/histidina, 10/10 mmol L⁻¹, capilar de sílica de 75 μm d.i. (L_{total}=56 cm, L_{efetivo}=50 cm). A e B – utilizando como terra da CE um eletrodo de Pt introduzido no poço de tampão, C, D e E – utilizando como terra o eletrodo de ouro interno da microestrutura.

Não se observou alteração sensível da estabilidade ou ruído da linha base pelo fato de se utilizar o eletrodo de ouro interno à microestrutura como terra para a eletroforese capilar ou um fio de platina imerso no poço de tampão ao final da microestrutura, como se pode observar na figura 36.

Estes resultados exploratórios indicam que as células microfluídicas poderão vir a constituir uma alternativa vantajosa à célula descrita nas figuras 34 e 35 para pré-concentração dos metais e posterior separação e determinação por CE, devendo ensejar pesquisas futuras.

4.4.4 – Ensaio iniciais de ECPC-FIA acoplada a CE-C4D para alguns cátions metálicos

Os testes iniciais do sistema ECPC-FIA-CE-C4D ilustrado na figura 35 recorrendo à célula detalhada na figura 34 foram feitos com solução de Cu^{2+} 3 ppm, nas condições indicadas na figura 38. Para afastar a hipótese de que o fluxo de solução com analito que passa na célula junto à extremidade do capilar de sílica pudesse apresentar suficiente pressão positiva para introduzir uma alíquota da amostra no capilar já durante a etapa de deposição eletroquímica do analito, tanto maior quanto mais longa a etapa de deposição, basta notar que o eletroferograma A não apresenta pico de Cu^{2+} .

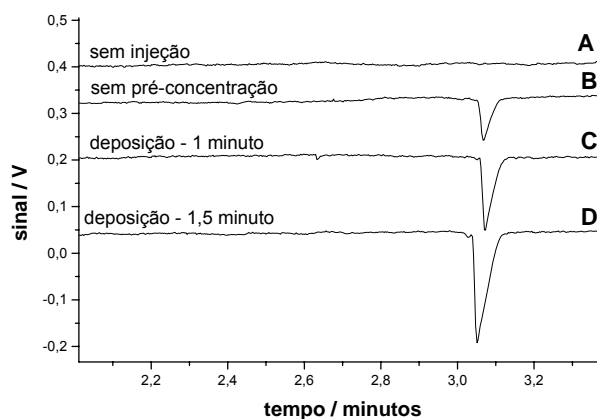


Figura 38 – Eletroferogramas para solução contendo 3 ppm de íons Cu^{2+} , utilizando-se célula para ECPC-FIA-CE-C4D. Deposição: $-1,0\text{ V}$ (amostra em tampão HAc/Ac^- , $20/20\text{ mmol L}^{-1}$), redissolução: $+0,8\text{ V}$ (em meio de tampão $\text{MES}/\text{histidina}$, $10/10\text{ mmol L}^{-1}$). Eletroforese capilar – potencial de separação: -25 kV , tampão: $\text{MES}/\text{histidina}$, $10/10\text{ mmol L}^{-1}$, capilar de sílica de $75\text{ }\mu\text{m}$ d.i. ($L_{\text{total}}=56\text{ cm}$, $L_{\text{efetivo}}=50\text{ cm}$) e injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 30 s . A – passagem de amostra por 3 minutos , sem injeção, B – injeção direta da amostra, C – pré-concentração 1 min , D – pré-concentração $1,5\text{ min}$.

A figura 38 mostra aumento do sinal dos íons Cu^{2+} para tempos crescentes de deposição antes da redissolução, além do sinal obtido para a injeção da solução do analito diretamente, o que comprova, ao menos para Cu^{2+} , o funcionamento da pré-concentração, mesmo que sem eficiência desejável.

Na seqüência optou-se por avaliar a capacidade do sistema para uma mistura contendo 1 ppm dos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , como ilustrado na figura 39.

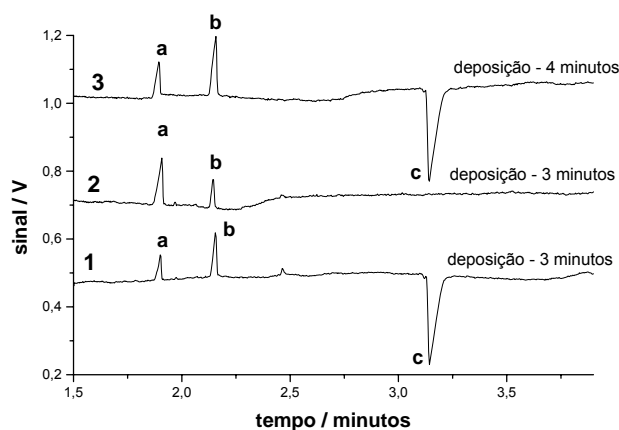


Figura 39– Eletroferogramas de solução contendo mistura dos íons metálicos após pré-concentração eletroquímica. Eletroforese capilar: condições como figura 38. Deposição: -2,0 V, em tampão HAc/Ac^- , redissolução: +1,0 V em tampão ácido láctico/histidina, 10/10 mmol L^{-1} . 1 – mistura Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} (1 ppm cada), 3 min de deposição; 2 - mistura Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} (1 ppm cada), 3 min de deposição; 3 - mistura Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} (1 ppm cada), 4 min de deposição. Picos: **a**- Cd^{2+} , **b**- Zn^{2+} e **c**- Cu^{2+} .

Pode-se observar que há aumento do sinal do pico de Cd^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} quando se aumenta o tempo de deposição (curvas 1 e 3), não sendo observado sinal apreciável para os íons Pb^{2+} . No entanto, pode-se observar que na ausência de íons Cu^{2+} , para o mesmo tempo de deposição, há um sensível aumento no sinal dos íons Cd^{2+} e

decréscimo no sinal dos íons Zn^{2+} . Possíveis explicações para esse fato seriam a formação de compostos intermetálicos que dificultem a deposição/redissolução do cádmio na presença de cobre, e favoreçam o zinco, ou a alteração da superfície do eletrodo pela deposição preferencial e gradual do cobre (que se dá em potenciais menos negativos), alterando as características do mesmo. Independentemente desse fato, observou-se que os resultados obtidos estão longe de satisfatórios em termos de sensibilidade. Acredita-se que isso se deva principalmente a problemas relacionados à configuração e geometria da célula utilizada e não a problemas oriundos do sistema eletroquímico em si.

Como fatores desfavoráveis quanto a célula proposta pode-se apontar dois: seu grande volume interno e dificuldade de ajustar o capilar na interface entre os sistemas eletroforético e eletroquímico. O volume interno da célula – grande frente ao que é transferido para a CE – ocasiona retenção de fração menor dos analitos injetados, diluição maior dos mesmos na redissolução anódica e aumenta as quantidades de amostra e tampão (por vezes caro) para operação, lavagem e condicionamento dos experimentos. Como visto em trabalho onde se relata a modificação eletroquímica de substâncias previamente à sua introdução no sistema de eletroforese capilar[48], o controle do posicionamento e distanciamento entre a extremidade do capilar e a superfície do eletrodo são fundamentais para o bom-funcionamento do sistema.

4.4.5 – ECPC-FIA-CE-C4D

Para os testes iniciais do sistema foram escolhidos íons metálicos cuja determinação em amostras reais (ambientais, industriais) fosse relevante e cuja determinação simultânea por ASV não pudesse ser levada a cabo tão facilmente, seja pela proximidade de seus potenciais de oxidação seja devido à formação de compostos intermetálicos, caso este em que o poder de separação conseguido pela CE poderia tornar viável a resolução e análise dos analitos. Desta forma, os cátions metálicos escolhidos para se iniciar o trabalho foram Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} .

As corridas eletroforéticas, salvo quando mencionado o contrário, foram realizadas utilizando tampão ácido acético/acetato, 20/20 mmol L^{-1} , com injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 30 s. As separações foram conduzidas sob potencial de -20 kV. Embora se esperasse que o tampão escolhido não levasse a cabo uma boa separação de um conjunto muito grande de íons metálicos sua escolha, para estes estudos exploratórios, se deu em função de sua compatibilidade com o sistema eletroquímico acoplado. As soluções de íons metálicos utilizadas foram preparadas no mesmo tampão de corrida (Hac/Ac^- , 20/20 mmol L^{-1}).

Inicialmente foram efetuadas corridas com os cátions isoladamente (10 ppm) e depois com uma solução contendo uma mistura dos 4 cátions (10 ppm de cada), como pode ser visto nos eletroferogramas da figura 40 apresentados na seqüência.

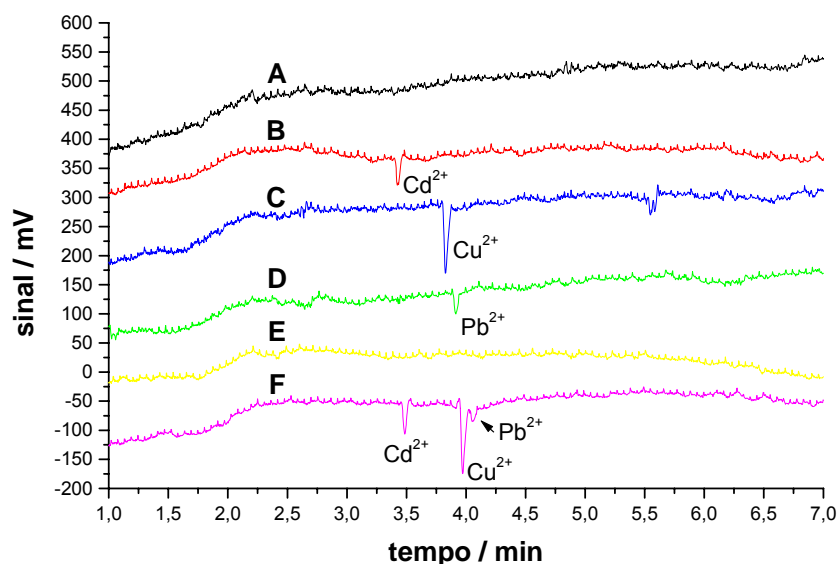


Figura 40 – Eletroferogramas obtidos para corridas efetuadas a -20 kV em tampão HAc/Ac⁻, $20/20$ mmol L⁻¹, capilar de sílica de aproximadamente 50 cm (d.i. 50 μ m) e injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água durante 10 s. A – tampão (branco), B – solução de Cd²⁺ 10 ppm, C – solução de Cu²⁺ 10 ppm, D – solução de Pb²⁺ 10 ppm, E – solução de Zn²⁺ 10 ppm, F – solução de Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺ 10 ppm.

Não foi possível detectar zinco mesmo nesta concentração relativamente alta e houve sobreposição parcial dos picos de cobre e chumbo, mas mesmo a despeito de não se conseguir uma resolução adequada dos metais envolvidos, optou-se por prosseguir os estudos com o cobre, tomado como íon teste por ter apresentado o maior sinal dentre os cátions estudados. Os primeiros testes efetuados com a cela de pré-concentração constituíram em fazer injeções de solução de cobre (1 ppm) e realizar

corrida eletroforética ainda sem e com pré-concentração, para observar o efeito de acumulação e aumento do sinal obtido. Inicialmente, a solução 1 ppm de cobre foi preparada no mesmo tampão de corrida da eletroforese (Hac/Ac^- 20/20 mmol L^{-1}) e os teste de pré-concentração foram efetuados para tempos crescentes de deposição, sempre se efetuando a redissolução na solução de cobre 1 ppm. A corrida eletroforética foi efetuada a -20 kV efetuando-se injeções hidrodinâmicas de 30 s, sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água. Como pode ser observado na figura 41, o aumento dos tempos de concentração não levou a um aumento significativo dos picos correspondentes ao cobre, contrariando o esperado. O surgimento do sinal analítico para 1 minuto de pré-concentração permite afirmar que a pré-concentração ocorreu, embora evidenciado que esta se dê em uma condição pouco adequada.

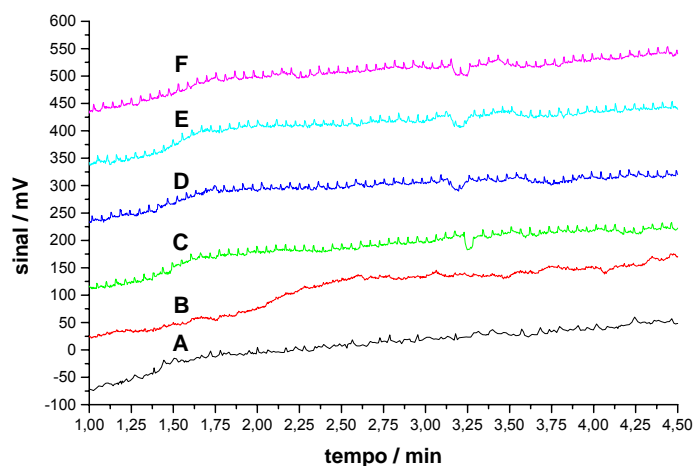


Figura 41 – Avaliação da pré-concentração obtida no sistema ECPC-FIA-CE-C4D, para tempos crescentes de deposição, condições experimentais como indicado na figura 40, exceto injeção hidrodinâmica sob pressão reduzida de 10 cm de coluna d'água por 30 s. Deposição feita a -500 mV e redissolução a 500 mV. A – injeção de tampão (branco), B – sem pré-concentração, C – deposição 1 minuto, D – deposição 2 minutos, E – deposição 3 minutos, F – deposição 5 minutos.

Antes de se prosseguir com os testes de pré-concentração registraram-se alguns voltamogramas para ter idéia dos potenciais de deposição e redissolução do cobre nas condições escolhidas, servindo de ilustração a figura 42. Adicionando-se cloreto à amostra, observa-se que a deposição do cobre é muito favorecida, e os sinais analíticos obtidos por ASV (deposição em -500 mV, varredura de -500 V a 800 mV) para solução 1 ppm de cobre são sensivelmente ampliados quando se tem a presença de cloreto.

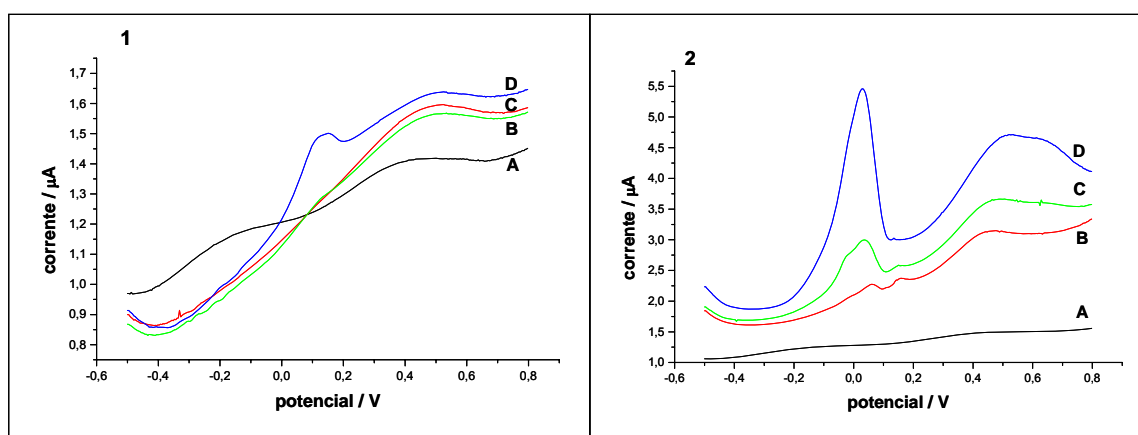


Figura 42 – Voltamogramas para solução 1 ppm de cobre em preparada em meio de tampão HAc/Ac^- , $20/20$ mmol L^{-1} , na ausência (1) ou presença (2) de cloreto, sendo efetuada deposição em tempos variáveis a $-0,5$ V, varredura posterior de $-0,5$ a $+0,8$ V, com onda quadrada, 120 Hz. **1** – estudos na ausência de cloreto, A – branco, 60 s de deposição com solução contendo apenas tampão, B – 30 s de deposição, C - 15 s de deposição, D – 60 s de deposição; **2** - presença de 20 mmol L^{-1} de cloreto, A – branco, 60 s de deposição com solução contendo apenas tampão e cloreto, B – 15 s de deposição, C - 30 s de deposição, D – 60 s de deposição;

Constata-se que quando a deposição (15 , 30 e 60 s) e redissolução são efetuadas em meio tampão HAc/AC^- , há ligeiro aumento na quantidade de composto formado que se oxida por volta de 500 mV, sendo perceptível pico de oxidação a

aproximadamente 100 mV somente para tempo de deposição de 60 s ou mais. Já no caso da deposição (15, 30 e 60 s) e redissolução efetuadas em meio contendo cloreto, observa-se que os picos de oxidação a 0 V e a 500 mV são bastante mais acentuados, o que parece indicar que a deposição e/ou a oxidação do cobre em meio de cloreto deve ser bastante favorecida. Acredita-se que o intenso aumento por volta de 100 mV possa ser devido à estabilização de Cu^{+1} em meio de cloreto, embora uma afirmação mais embasada necessite de teste voltamétricos adicionais por outras técnicas além da SWV.

Realizou-se então a substituição do tampão utilizado na preparação da solução de cobre por HNO_3 (20 mmol L^{-1}), adicionando-se também cloreto (10 mmol L^{-1}). A diferença entre os resultados obtidos para as eficiências das pré-concentrações nos diferentes meios estudados pode ser vista na figura 43. A melhora ao se efetuar a troca é perceptível, principalmente no aumento e estreitamento do pico obtido na utilização de HNO_3/Cl^- (eletroferograma D), com uma eficiência muito maior à obtida no caso da preparação em meio HAc/Ac^- (eletroferograma C).

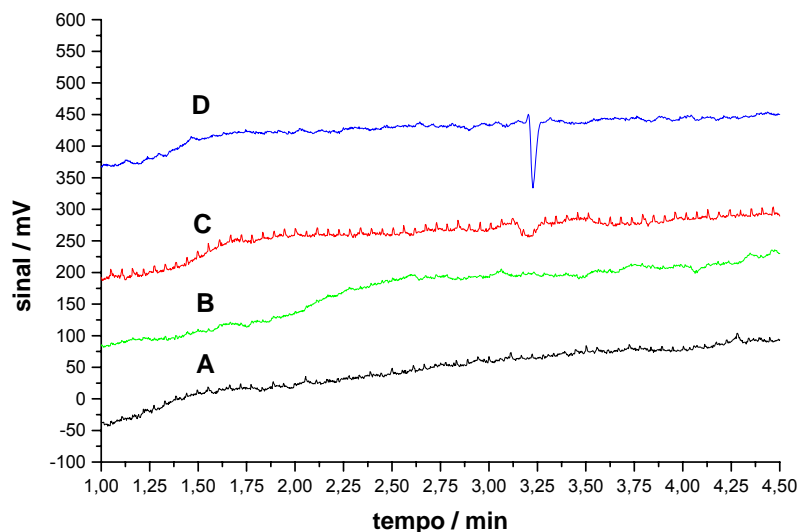


Figura 43 – Variação dos eletrólitos utilizados na preparação de solução de cobre e efeitos obtidos na pré-concentração. Condições experimentais como descrito na figura 42. A – procedimento realizado com tampão HAc/Ac⁻ apenas, B – solução 1 ppm de cobre em tampão HAc/Ac⁻, sem pré-concentração, C – solução de cobre preparada em HAc/Ac⁻, com deposição de 2 minutos, D – solução de cobre preparada em HNO₃/Cl⁻, pré-concentração de 1 minuto.

Com base nos resultados obtidos, optou-se por efetuar a preparação da solução de cobre a 1 ppm em meio de 20 mmol L⁻¹ de HNO₃ e 10 mmol L⁻¹ de cloreto. Os resultados obtidos para a pré-concentração na presença de cloreto se mostraram bastante favoráveis, como apresentado na figura 43. O aumento dos tempos de concentração (mostrados na figura 44) indica sinais analíticos crescentes, sem perda de eficiência de separação.

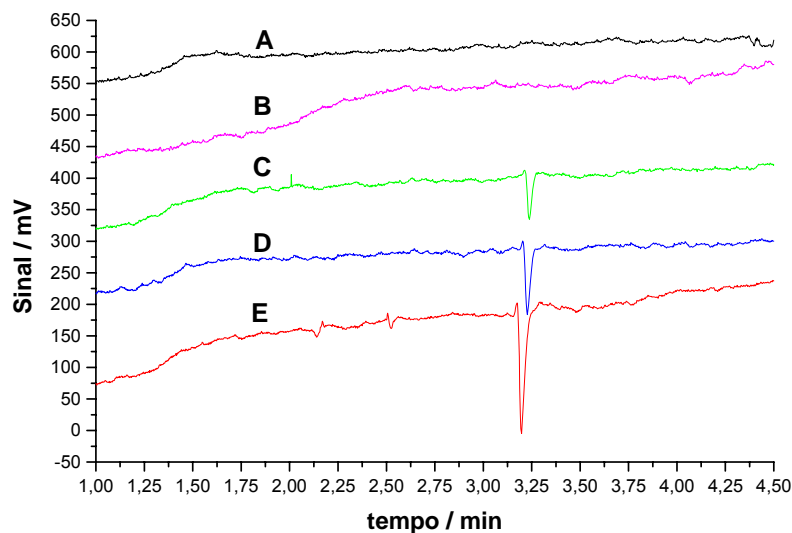


Figura 44 – Eletroferogramas obtidos para tempos crescentes de pré-concentração de cobre em meio de cloreto. Condições experimentais como descritas na figura 40. Solução 1 ppm de cobre preparada em meio $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ e $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$. A – somente com tampão de corrida HAc/Ac^- , B – solução 1 ppm de cobre sem pré-concentração, C – solução 1 ppm de cobre com 30 s de deposição, D – solução 1 ppm de cobre com 60 s de deposição, E – solução 1 ppm de cobre com 120 s de deposição,

Esses resultados permitem inferir a potencialidade da técnica de pré-concentração eletroquímica alcançada em condições de fluxo com a célula desenvolvida, evidenciando sua aplicabilidade a situações analíticas de natureza semelhante, como troca de matriz (*clean-up*), pré-concentração por adsorção induzida por ligantes (orgânicos) sob controle de potencial e derivatização de espécies não detectáveis diretamente por eletroforese ou determinações diferenciais mediadas eletroquimicamente.

5

Conclusões

e Perspectivas

5- Conclusões e Perspectivas

Entre as diversas contribuições desta tese, merece destaque em termos de originalidade, a proposta da simbiose ECPC-CE, por unir a efetividade da acumulação de certos analitos por meios eletroquímicos com a capacidade de separação rápida de componentes (principalmente espécies iônicas) da eletroforese. Os dispositivos criados/adaptados viabilizaram a realização da ECPC em fluxo com interface direta para transferência (injeção) hidrodinâmica (ou eletrocinética) de amostra no capilar de separação eletroforética. A validação do conceito e a demonstração do funcionamento do protótipo criado para a implementação instrumental da ECPC-FIA-CE-C4D se deu utilizando amostra salina com íons de cobre como sistema modelo. Uma célula microfluídica também foi concebida recorrendo a técnicas ao alcance de qualquer laboratório e os problemas de construção foram equacionadas, abrindo caminho para posterior evolução até um protótipo funcional. Por sua potencialidade, as idéias e dispositivos construídos poderão atrair outros pesquisadores ao aprimoramento da instrumentação, otimização dos parâmetros operacionais do sistema analítico e estabelecimento de aplicações reais, tais como análise de metais tóxicos em amostras ambientais.

Ressalte-se que a ECPC-FIA-CE-C4D, na forma proposta, é um sistema analítico totalmente eletroquímico, da pré-concentração por redução (ou oxidação, ou adsorção), seguida de liberação dos analitos (*stripping*) por oxidação (redução,

dessorção), passando pela separação por eletromigração sob efeito de fluxo eletrosmótico e alcançando a detecção dos componentes pela diferença da condutância frente ao tampão. O baixo custo de construção e manutenção da instrumentação eletroquímica – que não requer chama, plasma, pressão elevada ou alto vácuo – aliados ao baixo consumo de energia, portabilidade e facilidade de miniaturização e automação, são atrativos a incentivar pesquisas como: i) mudança do material dos eletrodos, alteração na geometria das células e definição de parâmetros experimentais para ampliação da sensibilidade e do leque de aplicações; ii) avaliação de outros tipos de tratamentos eletroquímicos (troca de matriz, *clean-up* de amostras, derivatização eletroquímica);

Não menos relevantes são as demais contribuições da tese, algumas ainda incompletas, mas com grande potencial de desencadeamento de pesquisas futuras, podendo-se sumariá-las nas seguintes conclusões, considerações e perspectivas:

a) a utilização do C4D como detector em FIA mostrou-se uma alternativa promissora para as aplicações almejadas: i) como elemento de sincronização da interface FIA-CE, por gerar sinais transientes bem definidos (tal forma de sincronização não foi avaliada na tese, pois o controle de deslocamento de fluidos proporcionado pelas microbombas pulsadas sob controle de computador foi suficiente) e ii) como detector convencional para FIA, desde que empregado método adequado para conferir seletividade à determinação, como também confirmam exemplos surgidos na literatura recente;

b) A determinação de aminas de baixo peso molecular utilizando CE-C4D é alternativa viável e confiável, demonstrada com o desenvolvimento de método analítico completo e validado para a análise de CDMAE em produtos cosméticos, e com potencial para viabilização de métodos para análise simultânea de muitas outras aminas, expandindo as opções existentes na literatura;

c) Confirmou-se a aplicabilidade da CE-C4D à determinação de cátions metálicos e ampliou-se a gama de aplicações descrita na literatura com a adição de elementos ainda não relatados: Ag^+ , Tl^+ e As(III) . Apesar de apresentar sensibilidade inferior à de outras técnicas como ASV e CSV, por sua resolução muito superior, a CE-C4D permite a determinação de um número maior de cátions (inclusive, não eletroativos) numa mesma amostra;

c) A CE de aminas de baixo peso molecular em matrizes complexas pode ser convenientemente precedida de extração líquido/gás/líquido em que se promove a volatilização das aminas por incremento de pH da fase doadora e se coleta as aminas da fase gasosa em fase aquosa com pH que assegure a protonação dos analitos e seja também compatível com a CE. Em vista do pequeno volume de amostra requerido pela CE, demonstrou-se que a coleta com pré-concentração pode ser feita com extensão relativamente curta de tubo capilar microporoso (Oxyphan) tanto na cela maior de extração descontínua (compatível com técnicas como a pervaporação), como com a cela de microextração com tubos concêntricos, na qual a fase gasosa se limita aos microporos da membrana capilar pela qual circula a solução acceptora.

d) Automação do sistema em fluxo como o microextrator líquido/gás/líquido interfaceado à CE deu flexibilidade e repetibilidade ao funcionamento, com perfeito controle do posicionamento do plugue de amostra extraída no entorno do capilar, para realização da injeção. Os resultados iniciais favoráveis estimulam posterior continuidade das pesquisas para avaliação da eficiência, reprodutibilidade e durabilidade dos dispositivos do sistema e definição de procedimentos completos de análise.

6- Referências

- [1] Simonet, B. M., Rios, A., Valcarcel, M., *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22, 605-614.
- [2] Tavares, M. F. M., *Quim Nova* 1996, 19, 173-181.
- [3] Tomlinson, A. J., Guzman, N. A., Naylor, S., *J Capillary Electrop* 1995, 2, 247-266.
- [4] Timerbaev, A. R., Buchberger, W., *J Chromatogr A* 1999, 834, 117-132.
- [5] Osbourn, D. M., Weiss, D. J., Lunte, C. E., *Electrophoresis* 2000, 21, 2768-2779.
- [6] Fang, Z. L., *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH, Weinheim, Germany, 1993.
- [7] Nobrega, J. A., Neves, E. A., Rocha, F. R. P., Luccas, P. O., *et al.*, *Quim Nova* 1996, 19, 684-687.
- [8] Ruzicka, J., Hansen, E. H., *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2008, 27, 390-393.
- [9] Zhang, Z. J., He, D. Y., Liu, W., Lv, Y., *Luminescence* 2005, 20, 377-381.
- [10] Doku, G. N., Haswell, S. J., *Anal Chim Acta* 1999, 382, 1-13.
- [11] Zlotorzynski, A., *Crit Rev Anal Chem* 1995, 25, 43-76.
- [12] Smith, F. E., Arsenault, E. A., *Talanta* 1996, 43, 1207-1268.
- [13] Ashley, K., *Electroanal* 1995, 7, 1189-1192.
- [14] Mattsson, G., Nyholm, L., Olin, A., Ornemark, U., *Talanta* 1995, 42, 817-825.
- [15] Cavicchioli, A., Gutz, I. G. R., *Anal Chim Acta* 2001, 445, 127-138.
- [16] Kuban, P., Engstrom, A., Olsson, J. C., Thorsen, G., *et al.*, *Anal Chim Acta* 1997, 337, 117-124.
- [17] Valcarcel, M., Arce, L., Rios, A., *J Chromatogr A* 2001, 924, 3-30.

- [18] Miranda, C. E. S., Carrilho, E., Gervasio, A. P., Gine, M. F., *Quim Nova* 2002, 25, 412-419.
- [19] Hogan, B. L., Lunte, S. M., Stobaugh, J. F., Lunte, C. E., *Anal Chem* 1994, 66, 596-602.
- [20] Chen, H. W., Fang, Z. L., *Anal Chim Acta* 1997, 355, 135-143.
- [21] Arce, L., Kuban, P., Rios, A., Valcarcel, M., Karlberg, B., *Anal Chim Acta* 1999, 390, 39-44.
- [22] Chen, H. W., Fang, Z. L., *Anal Chim Acta* 1998, 376, 209-220.
- [23] Kuban, P., Karlberg, B., *Talanta* 1998, 45, 477-484.
- [24] Palgrossi, F. S., *Desenvolvimento e avaliação de sistema envolvendo interface de análise por injeção em fluxo com eletroforese capilar*, Instituto de Química - Universidade de São Paulo 2002.
- [25] Palgrossi, F. S., Pedrotti, J. J., Gutz, I. G. R., *Quim Nova* 2001, 24, 689-692.
- [26] da Silva, J. A. F., do Lago, C. L., *Anal Chem* 1998, 70, 4339-4343.
- [27] da Silva, J. A. F., *Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética*, Instituto de Química - Universidade de São Paulo 2001.
- [28] da Silva, J. A. F., Guzman, N., do Lago, C. L., *J Chromatogr A* 2002, 942, 249-258.
- [29] Brito-Neto, J. G. A., da Silva, J. A. F., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanal* 2005, 17, 1198-1206.
- [30] Brito-Neto, J. G. A., da Silva, J. A. F., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanal* 2005, 17, 1207-1214.
- [31] Kuban, V., *Crit Rev Anal Chem* 1991, 22, 477-557.

- [32] Facchin, I., Pasquini, C., *Quim Nova* 1998, 21, 60-68.
- [33] de Oliveira, A. R. M., Magalhaes, I. R. D., de Santana, F. J. M., Bonato, P. S., *Quim Nova* 2008, 31, 637-644.
- [34] Calatayud, J. M., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*, Taylor & Francis, London, UK 1996.
- [35] Audunsson, G., *Anal Chem* 1986, 58, 2714-2723.
- [36] Jonsson, J. A., Mathiasson, L., *J Chromatogr A* 2000, 902, 205-225.
- [37] van de Merbel, N. C., *J Chromatogr A* 1999, 856, 55-82.
- [38] Cordero, B. M., Pavon, J. L. P., Pinto, C. G., Laespada, M. E. F., *et al.*, *J Chromatogr A* 2000, 902, 195-204.
- [39] Rocha, F. R., Silva, J.A.F., Lago, C.L., Gutz, I.G.R., *Análise de NH₃ no ar com coleta através de tubos capilares microporosos e determinação por eletroforese capilar*, Livro de resumos - XI Encontro Nacional de Química Analítica 2001.
- [40] Rocha, F. R., Silva, J.A.F., Gutz, I.G.R., Lago, L., *Capillary electrophoresis determination of formaldehyde in air employing a derivatization procedure, porous polypropylene capillaries and oscilometric detection*, Livro de resumos - V LACE (Simpósio Latinoamericano de Eletroforese Capilar em Aplicações Biomédicas, Farmacêuticas e Industriais) 2000.
- [41] Rocha, F. R., Coelho, L. H. G., Lopes, M. L. A., Carvalho, L. R. F., *et al.*, *Talanta* 2008, 76, 271-275.
- [42] Palmarsdottir, S., Thordarson, E., Edholm, L. E., Jonsson, J. A., Mathiasson, L., *Anal Chem* 1997, 69, 1732-1737.

- [43] Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., Krogh, M., Ugland, H. G., Gronhaug, T., *J Chromatogr A* 2000, 873, 3-11.
- [44] Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *J Chromatogr A* 2001, 909, 87-93.
- [45] Beinrohr, E., *Mikrochim Acta* 1995, 120, 39-52.
- [46] Pretty, J. R., Deng, H. T., Goeringer, D. E., Van Berkel, G. J., *Anal Chem* 2000, 72, 2066-2074.
- [47] Hissner, F., Mattusch, J., Werner, G., *Fresen J Anal Chem* 1996, 354, 718-721.
- [48] Matysik, F. M., *Electrochem Commun* 2003, 5, 1021-1024.
- [49] Kuban, P., Hauser, P. C., *Anal Chim Acta* 2008, 607, 15-29.
- [50] Chiu, T. C., Lin, Y. W., Huang, Y. F., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2006, 27, 4792-4807.
- [51] Fei, X. Q., Li, C., Yu, X. D., Chen, H. Y., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007, 854, 224-229.
- [52] Cortacero-Ramirez, S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., *Food Chemistry* 2007, 100, 383-389.
- [53] Hirokawa, T., Okamoto, H., Gosyo, Y., Tsuda, T., Timerbaev, A. R., *Anal Chim Acta* 2007, 581, 83-88.
- [54] Ruiz-Jimenez, J., de Castro, M. D. L., *J Chromatogr A* 2006, 1110, 245-253.
- [55] Timm, M., Jorgensen, B. M., *Food Chemistry* 2002, 76, 509-518.
- [56] Lange, J., Thomas, K., Wittmann, C., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002, 779, 229-239.

- [57] Fekete, A., Frommberger, M., Ping, G. C., Lahaniatis, M. R., *et al.*, *Electrophoresis* 2006, 27, 1237-1247.
- [58] Chu, Q. C., Guan, Y. Q., Geng, C. H., Ye, J. N., *Analytical Letters* 2006, 39, 729-740.
- [59] Kvasnicka, F., Voldrich, M., *J Chromatogr A* 2006, 1103, 145-149.
- [60] Gong, X. Y., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2006, 27, 468-473.
- [61] Gong, X. Y., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2006, 27, 4375-4382.
- [62] Pfeiffer, C. C., Jenney, E. H., Gallagher, W., Smith, R. P., *et al.*, *Science* 1957, 126, 610-611.
- [63] Barsa, J. A., Saunders, J. C., *American Journal of Psychiatry* 1959, 116, 255-256.
- [64] Oettinger, L., *Journal of Pediatrics* 1958, 53, 671-675.
- [65] Coleman, N., Dexheimer, P., Dimascio, A., Redman, W., Finnerty, R., *Psychosomatics* 1976, 17, 68-72.
- [66] Miller, E. M., *New England Journal of Medicine* 1974, 291, 796-797.
- [67] Casey, D. E., Denney, D., *New England Journal of Medicine* 1974, 291, 797-797.
- [68] Grossman, R., *American Journal of Clinical Dermatology* 2005, 6, 39-47.
- [69] ANVISA, Parecer Técnico nº 2 2003.
- [70] Oddos, T., Bertin, C. T., Robert, A., Fournier, M., *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004, 50, P76-P76.
- [71] Clark, C. R., *Clinics in Plastic Surgery* 2001, 28, 745-+.
- [72] Morissette, G., Germain, L., Marceau, F., *British Journal of Dermatology* 2007, 156, 433-439.

- [73] Wang, L. H., Hsia, H. C., Wang, C. C., *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2006, 29, 1737-1751.
- [74] Kamp, E., Eisenbrand, G., *Food and Chemical Toxicology* 1991, 29, 203-209.
- [75] Fukui, M., Konishi, H., Ohta, K., Tanaka, K., *Bunseki Kagaku* 1992, 41, T27-T31.
- [76] Batista, I. A. S. A., *Desenvolvimento de métodos de análise e estudos de estabilidade de produtos cosméticos contendo dimetilaminoetanol (DMAE)*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo 2008.
- [77] Antunes Junior, O. B., I.A.S.; Santoro, M.I.R.M.; Gutz, I.G.R., *Determinação de DMAE em formulações cosméticas por eletroforese capilar.*, Livro de Resumos do 14º Encontro Nacional de Química Analítica 2007.
- [78] Siddiqi, Z. M., Pathania, D., *Talanta* 2003, 60, 1197-1203.
- [79] Citron, I. M., Dolan, D., *Anal Chim Acta* 1965, 33, 612-&.
- [80] Smith, R. E., Davis, W. R., *Anal Chem* 1984, 56, 2345-2349.
- [81] Darwish, I. A., *Anal Chim Acta* 2005, 551, 222-231.
- [82] Foster, R., Thompson, T. J., *Transactions of the Faraday Society* 1963, 59, 296-&.
- [83] Yamaoka, T., Nagakura, S., *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1971, 44, 2971-&.
- [84] Shah, S. B., Murthy, A. S. N., *Journal of Physical Chemistry* 1975, 79, 322-326.
- [85] Lafis, S., Konidari, C. N., Veltsistas, P. G., Tzerpos, N., Karayannis, M. I., *International Journal of Chemical Kinetics* 1997, 29, 385-391.
- [86] Buteau, C., Duitschaever, C. L., Ashton, G. C., *Journal of Chromatography* 1984, 284, 201-210.

- [87] Moret, S., Bortolomeazzi, R., Lercker, G., *Journal of Chromatography* 1992, 591, 175-180.
- [88] Paleologos, E. K., Chytiri, S. D., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G., *Journal of Chromatography A* 2003, 1010, 217-224.
- [89] Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G., *Food Microbiology* 2004, 21, 549-557.
- [90] Fang, Z. L., Liu, Z. S., Shen, Q., *Anal Chim Acta* 1997, 346, 135-143.
- [91] <http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html> acessado em julho/2008.
- [92] Richter, E. M., Augelli, M. A., Kume, G. H., Mioshi, R. N., Angnes, L., *Fresen J Anal Chem* 2000, 366, 444-448.
- [93] Daniel, D., Gutz, I. G. R., *Electroanal* 2001, 13, 681-685.
- [94] Daniel, D., Gutz, I. G. R., *Electrochem Commun* 2003, 5, 782-786.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)