UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Aplicação de Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica Sem Contato à Determinação de Espécies Neutras

Alexandre Zatkovskis Carvalho
Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR
Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

SÃO PAULO
AGOSTO DE 2003

"Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de espécies neutras"

ALEXANDRE ZATKOVSKIS CARVALHO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química - Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Prof. Dr. EMANUEL CARRILHO
IQ – SC – USP

SÃO PAULO
20 DE AGOSTO 2003.

ÍNDICE

I. Agradecimentos

II. Resumo

III Abstract

IV. Glossário

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos 01

1.1. Breve discussão sobre a definição de espécie não-iônica 01

1.2. Breve introdução à eletroforese capilar 02

1.3. Migração das espécies em eletroforese capilar 04

1.4. Modalidades de separações eletroforéticas 08

1.5. Sistemas de detecção 13

1.6. Detecção condutométrica sem contato – CCD 15

1.7. Objetivos 17

Capítulo 2 – Detecção de álcoois alifáticos 18

2.1. Introdução 18

2.2. Material e métodos 18

2.3. Resultados e discussão 21

2.4. Proposição do mecanismo de detecção em MEKC 38

Capítulo 3 – Determinação de carboidratos 43

3.1. Introdução 43

3.2. Material e métodos 44

3.3. Resultados e discussão 45

Capítulo 4 - Determinação de salbutamol 54

4.1. Introdução 54

4.2. Material e métodos 55

4.3. Resultados e discussão 56

Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas 61

V. Bibliografia

VI. Apêndice

VII. *Curriculum Vitae*

I. Agradecimentos

Dedico esta dissertação de todo o coração aos meus pais, Kátia e Antônio, pelo amor, ensinamentos, apoio e por toda a luta para não me faltar nada. Foram vocês que me conduziram até aqui.
Muito obrigado mãezona e paizão.

Uma dedicatória especial, para minha avó, Olga, quem me "carrega no colo" até hoje. É pensando na sua energia, amor e lucidez que recobro minhas forças nos momentos de cansaço.
Valeu vó!!!

A casa da praia, as pescarias, o joguinho de bilhar, a cervejinha, o Timão no Pacaembu, a confiança e apoio. Vô Vasilius, você estará sempre comigo. Muito obrigado.

Fê, amor, desta dissertação te dedico apenas algumas palavras, pela sua força, carinho compreensão ajuda e incentivo. De minha vida, dedico o livro todo, por tudo que você é.

Agradeço ao professor e amigo Claudimir, pelos ensinamentos, orientação e amizade, incluindo os momentos Sigma e os momentos de picaretagem.
Meus sinceros agaecimentos.

Agradeço ao meu padrinho Paulo,
de quem guardo tantas lembranças
boas...
E à minha madrinha Olga, sempre
presente.
Muito obrigado.

Agradeço a meus irmãos Renato e Marcelo, e à minha família, pela certeza de poder contar com vocês no momento que for preciso.

Agradeço aos professores Lúcio e Ivano Gutz, pela amizade e por todos os ensinamentos recebidos.

Agradeço especialmente à Alessandra, ao Carlos, ao Alberto e ao Wagner, que participaram de forma fundamental em partes deste trabalho, que em muito perderia sem essas valorosas contribuições.

Agradeço aos demais colegas e agregados do laboratório, José Geraldo, Dosil, Flávio, Willian, Fabiano, Vítor, Adalgisa, Márcio, Jairo, Carol, Vânia, Renato, Renata, Gil, André, Daniela, Osmar, Rodrigo, Sérgio, Lúcia, Socorro, Erik, Iranaldo, Zé Maria, Heron, Marcelo, Eduardo, Pilar, Robinson, Fernando, Ricardo, Marcone e Marlene pela ajuda, amizade e pelo excelente ambiente de trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do IQ, em especial ao pessoal da secretaria de pós-graduação, Cibele, Milton e Emiliano, sempre prontos a nos atender e ajudar.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro recebido, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

II. Resumo

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos para determinação de espécies neutras por eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (CCD). Estratégias baseadas em eletroforese capilar em solução livre (FSCE) e cromatografia micelar eletrocinética (MEKC) foram utilizadas em três casos: misturas de álcoois alifáticos, misturas de açúcares e salbutamol. Estas substâncias foram escolhidas por apresentarem ampla distribuição de características químicas. Os n-álcoois possuem regiões polares e apolares distintas ao longo da cadeia carbônica, sendo que em solução aquosa se apresentam invariavelmente como espécies neutras. Os açúcares, apesar das longas cadeias carbônicas, possuem grande número de hidroxilas uniformemente distribuídas e podem ser ionizados a valores elevados de pH. Já o salbutamol, pode ser encontrado como espécie catiônica, neutra ou aniônica, dependendo do pH do meio. A melhor aproximação para os álcoois foi MEKC, que permitiu a separação e detecção da ordem de 10^{-4} mol·L^{-1} para cinco isômeros de pentanol. A utilização de eletrólito de corrida com pH 12,1 permitiu a determinação de frutose, glicose, galactose e sacarose da ordem de 10^{-5} mol·L^{-1} por FSCE em capilares de 20 μm. Salbutamol pode ser detectado como cátion e ânion em FSCE em limites de detecção da ordem de dez vezes menores que aquele obtido para a espécie neutra por MEKC. Como o mecanismo pelo qual ocorre a detecção condutométrica em MEKC não era ainda bem conhecido, foram desenvolvidos experimentos que ajudassem a elucidá-lo. Medidas de condutividade, viscosidade e análise de impedância de soluções tampão com dodecilsulfato de sódio (SDS) com n-álcoois e experimentos com soluções similares em MEKC demonstraram que a resposta observada com CCD é bastante complexa, pois vários fenômenos contribuem para o comportamento da condutividade na região dos analitos. Os principais fenômenos, os quais não estavam sendo devidamente considerados em modelos anteriores, são a dissociação e a ionização provocadas pelos analitos sobre as micelas. Estes fenômenos seriam particularmente significativos para as mobilidades das espécies envolvidas nas micelas, provocando a propagação de vacâncias que seriam então detectadas.

III. Abstract

In the present work, analytical methods for determination of neutral species based on capillary electrophoresis (CE) with contactless conductivity detection (CCD) were developed. Free solution capillary electrophoresis (FSCE) and micelar electrokinetic chromatography (MEKC) were applied to three cases: mixtures of aliphatic alcohols, mixtures of sugars, and salbutamol. These substances were selected due to their distinctiveness. The alcohols have well-defined polar and apolar regions in their carbonic chain and are typical non-ionic species in aqueous medium. The sugars have a great number of hydroxyl groups along the carbonic chain, which give a polar nature and can be ionized at high pH values. The salbutamol is amphoteric. The best approach for the alcohols was MEKC that allowed separation of five pentanol isomers with limit of detection of 10^{-4} mol·L^{-1}. A running electrolyte with pH 12.1 allowed determination of 10^{-5} mol·L^{-1} of fructose, glucose, galactose, and sucrose, using FSCE with 20-μm inner diameter capillary. The sensitivity for the cationic and anionic forms of albuterol in FSCE was about ten times greater than that one achieved by MEKC for the neutral species. Since the conductivity detection in MEKC was not clearly understood, some experiments were carried out in order to improve the knowledge about it. Conductivity and viscosity measurement as well as impedance analysis of buffered sodium dodecyl sulfate solution with n-alcohols and experiments using similar conditions in MEKC showed that CCD response is complex, because several phenomena contribute to the solution conductivity in the region of the analytes. The main phenomena, which are not properly considered in the previous models, are the effects of the analytes on the dissociation and ionization of the micelles. These phenomena would be responsible for the vacancies detected as negative peaks, which would be formed by the augment of the mobilities of the species involved in the micelle formation.

IV. Glossário

Neste trabalho optamos por abreviações originárias do inglês. Não queremos com isso desmerecer nossa língua mãe, e sim tornar mais prático para o leitor que já possui prévio conhecimento do assunto, uma vez que na maior partes das vezes se tratam de siglas e expressões consagradas e amplamente difundidas.

CCD	Detecção condutométrica sem contato
CE	Eletroforese capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Eletroforese capilar de focalização isoelétrica
CITP	Isotacoforese capilar
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CZE	Eletroforese capilar em zona
EOF	Fluxo eletroosmótico
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LOD	Limite de detecção
MEKC	Cromatografia micelar eletrocinética
PI	Ponto isoelétrico
SC	Colato de sódio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNR	Relação sinal ruído
TEA	Tetraetilamônio

Capítulo 1

Introdução e objetivos

1.1 Breve discussão sobre a definição de espécie não-iônica

Neste trabalho encontraremos com freqüência o termo "espécies não-iônicas", que basicamente estará se referindo a álcoois alifáticos e mono e dissacarídeos.

O que podemos entender como uma espécie não-iônica? Aceitamos com facilidade que as espécies que se encontram ionizadas em condições próximas ao encontrado normalmente no nosso dia-a-dia, em nossos alimentos, em fluidos biológicos, produtos de limpeza, etc, são espécies iônicas e as que se encontram neutras são não-iônicas. Porém, sem essa breve discussão, seria muito provável que durante o trabalho a classificação de carboidratos separados justamente através da ionização dos mesmos em um pH elevado (em torno de 12) causasse uma certa dúvida quanto a classificação ou mesmo um certo descrédito quanto a qualidade do trabalho como um todo.

Não queremos reinventar os conceitos da química, queremos apenas ilustrar como a classificação de espécies quanto a uma determinada característica pode ser relativa e circunstancial. Os álcoois alifáticos, presentes no trabalho, são realmente espécies não-iônicas, até ionizarem. De fato, em pHs realmente elevados (em torno de 16), essas espécies também se ionizam.

Em Eletroforese capilar (CE) muitas vezes usamos estratégias dinâmicas para a separação de dois compostos, como o uso de um complexante, por exemplo, presente na composição do eletrólito de corrida. Por muitas vezes esse complexante é o responsável pela "incorporação" de uma carga a um composto neutro, quando da complexação. O contrário também pode ocorrer se um complexante de carga oposta ao composto forma um complexo neutro.

Por que não podemos classificar a espécie H^+, ou mais precisamente a espécie H_3O^+ como um complexante, que forma complexos de acordo com sua concentração (pH) e a constante de estabilidade das espécies (pKa)? Pura questão conceitual.

A classificação dos mono e dissacarídeos como espécies não-iônicas neste trabalho se deve principalmente ao fato das amostras terem sido sempre diluídas em água e se tornaram iônicas apenas dentro do capilar, em equilíbrio com o eletrólito de corrida. Portanto, mesmo essas espécies foram introduzidas como espécies neutras no capilar, daí essa classificação como espécie não iônica.

De fato, não discordamos desses conceitos, apenas estamos aproveitando a oportunidade para salientar a relatividade dos mesmos e, talvez, promover uma discussão interessante e sem qualquer pretensão revolucionária.

1.2 Breve introdução à eletroforese capilar

A eletroforese é definida como o movimento diferencial de espécies carregadas sob o efeito de um campo elétrico e trata-se de um fenômeno conhecido há muitas décadas. O responsável pela introdução dessa técnica para a separação de espécies foi Arne Tiselius, em 1937 [1]. Nesse trabalho, misturas de proteínas foram separadas em tubos contendo soluções tampão, sob o efeito de um campo elétrico.

Apesar da possibilidade de separar espécies de acordo com os experimentos de Tiselius, a eficiência da separação em solução livre é limitada pelo aquecimento da solução, que acentua de forma comprometedora a difusão térmica e a difusão das espécies. Durante muito tempo, e ainda hoje, a eletroforese é utilizada para separar espécies em meios não convectivos, como géis de poliacrilamida e agarose, muito utilizados para separações de macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos e ribonucléicos. A separação dessas espécies se dá, na maior parte das vezes, em meios denaturantes que fornecem um mesmo número de carga por unidade de peso molecular, permitindo a separação por tamanho.

As separações envolvendo essa abordagem, conhecida como *slab gels electrophoresis* (eletroforese em placas de gel), apresentam baixa eficiência, longos tempos de análise e severas limitações para a automação e detecção das bandas. Novamente a geração de calor (efeito Joule) é o fator limitante para o aumento de eficiência.

Em 1967 Hjertén [2] introduziu uma alternativa para a técnica. Ele desenvolveu um sistema que permitia girar um tubo em seu eixo longitudinal, de forma a minimizar os efeitos de convecção. Estava então introduzida a eletroforese em tubos abertos. Nessa época os tubos capilares tinhas seus diâmetros internos na ordem de milímetros. Em outro trabalho Hjertén contribuiu para a adaptação da eletroforese em gel usando tubos capilares [3].

Apenas próximo aos anos 80 a eletroforese começaria a desenvolver contornos de uma técnica de separação de alta eficiência. Nesses anos valiosos estudos foram realizados, levando ao aprimoramento da instrumentação e ao desenvolvimento da teoria relacionada a técnica. Os estudos de Mikkers e seu grupo levaram a avanços significativos para a descrição dos fenômenos de eletrodispersão de bandas [4].

Porém, foram Jorgenson e Lukacs [5,6] que, utilizando pela primeira vez capilares de sílica fundida com um diâmetro interno de 75 μm, cruzaram uma espécie de marco que separa a eletroforese descrita até o momento da CE. Eles são considerados os pais da CE não só pelos avanços na instrumentação, mas também pela valiosa contribuição na teoria de dispersão de bandas, relacionando os parâmetros instrumentais com os efeitos observados na separação de proteínas e aminoácidos.

A eletroforese capilar pode ser considerada um avanço recente entre as técnicas analíticas que tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, aumentando de forma vertical sua gama de aplicações e utilidade. A CE vem sendo aplicada na separação desde íons inorgânicos como o cloreto e o sódio até células inteiras, compreendendo dentro desse intervalo espécies orgânicas e inorgânicas de interesse de praticamente todas as áreas relacionadas às ciências naturais.

Uma característica que impulsionou muito as pesquisas envolvendo CE é o fato da instrumentação necessária ser relativamente simples, o que levou a muitos grupos idealizarem e construírem seus próprios equipamentos.

Alguns outros pontos atraentes da CE são:

- Baixo custo, não só pelo equipamento, mas por utilizar baixos volumes de reagentes, particularmente comparando com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Versatilidade, já que um único capilar pode ser utilizado para a separação de classes de compostos completamente diferentes, bastando apenas a adequação do eletrólito de corrida para a separação;
- Pequeno volume de amostra exigido;
- Tempos de análise em geral bem reduzidos.

O princípio básico de separação na eletroforese em soluções livres, como a introduzida por Tiselius, e a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), também conhecida como eletroforese capilar de zona (CZE) é o mesmo, ou seja, as diferenças nas velocidades adquiridas por espécies carregadas sob o efeito de um campo elétrico.

O que torna a CE uma técnica de alta eficiência é justamente o fato da separação ser realizada em tubos capilares de reduzido diâmetro, onde temos uma relação favorável entre o volume e a área superficial do capilar. Essa característica favorece a dissipação de calor e permite a aplicação de campos elétricos de separação mais elevados, tornando menos representativos os efeitos deletérios do aquecimento da solução (efeito Joule), o que reduz os tempos de análise e aumenta a eficiência da separação.

1.3 Migração das espécies em eletroforese capilar

A migração das espécies em CE é resultante da mobilidade iônica, ou eletroforética (μ_e), diretamente proporcional a carga (q) e inversamente proporcional aos fatores de atraso, ou atrito, que estão relacionados ao raio iônico (r) e a viscosidade do meio (η), conforme pode ser observado através da equação 1.1:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \qquad \text{Eq. 1.1}$$

Cabe salientar que o raio a ser considerado é o raio hidratado, ou em termos mais gerais, o raio solvatado. Dessa forma o equilíbrio solvoiônico influencia a mobilidade das espécies.

Com a aplicação de um potencial elétrico as espécies carregadas adquirem velocidades eletroforéticas (v_e), dependentes da magnitude do campo elétrico (E) estabelecido e da μ_e de cada espécie, conforme a equação 1.2:

$$v_e = \mu_e E \qquad \text{Eq. 1.2}$$

A v_e e a μ_e podem apresentar variações em seus valores para uma mesma espécie quando promovemos alguma alteração no eletrólito de corrida, ou seja, o meio onde se dá a separação. Não apenas mudanças de viscosidade ou de composição de solventes são importantes, mas alterações de pH ou a adição de um complexante ao eletrólito podem promover mudanças de mobilidade. Avaliamos a mobilidade e a velocidade eletroforética de forma mais precisa ao considerarmos a função de distribuição das espécies (α). Trata-se do conceito de mobilidade e velocidade eletroforéticas efetivas (μ_{ef} e v_{ef}, respectivamente), conforme as equações 1.3 e 1.4:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_e \qquad \text{Eq. 1.3}$$

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \qquad \text{Eq. 1.4}$$

Os conceitos de μ_{ef} e v_{ef} são de extrema importância, pois muitas vezes a resolução entre duas espécies com mobilidades muito semelhantes em uma mistura é possível através da

escolha adequada do pH ou de um complexante adequado, bastando que, respectivamente, os pKas ou as constantes de estabilidade (K_e) sejam diferentes, de forma a obtermos diferenciações de α que promovam a seletividade na separação em questão.

Em CE a migração das espécies depende também de um fenômeno importante, denominado fluxo eletroosmótico (EOF). O EOF é um fenômeno de dupla camada elétrica [7]. Devido a natureza química dos materiais, pode ocorrer a formação de uma dupla camada elétrica na superfície desses quando imersos em algumas soluções sob certas condições, devido a adsorção de moléculas ou íons carregados, ou pela própria ionização da superfície do material.

Especificamente para a sílica fundida (SiO_2), material mais utilizado para fabricação de capilares utilizados em CE, a dupla camada elétrica é formada pela presença de um número representativo de grupos silanóis (SiOH) residuais. Esses grupos são ácidos relativamente fracos e, dependendo do pH, apresentam um determinado grau de ionização. Em pH 4 a sílica começa a apresentar uma porção significativa de grupos silanóis desprotonados. Em pH 8 a ionização já é praticamente completa e acima desse pH não ocorre mais um aumento significativo da carga negativa na parede do capilar.

As espécies catiônicas presentes no eletrólito são responsáveis por manter a eletroneutralidade do sistema próximo a parede do capilar, criando uma camada fortemente aderida à parede do capilar e uma camada difusa, com uma interação mais fraca. À medida que caminhamos para o meio do capilar a "camada de cátions" vai se dissipando, até atingir a relação 1:1 com o contra íon do eletrólito.

Ao se aplicar um potencial elétrico longitudinal nesse sistema começa a ocorrer a migração dos íons para os pólos de carga oposta. No centro da solução ocorre normalmente a migração dos ânions para o ânodo e dos cátions para o cátodo. Obviamente, apesar de carregado, o capilar não adquire qualquer movimento. As cargas mais próximas ao capilar também não migram, porém a camada difusa é arrastada, o que provoca a migração de um número maior de cátions em direção ao cátodo do que de ânions em direção ao ânodo.

Devido às interações solvoiônicas, a movimentação da camada difusa promove o deslocamento de toda a solução em direção ao cátodo. Esse fluxo gerado é o EOF.

O EOF apresenta um perfil planar, diferindo do perfil parabólico observado no fluxo laminar de fluidos gerado por pressão, como o fluxo desenvolvido em HPLC (fig 1.1). Essa característica observada em CE possibilita uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo, um dos motivos que torna a CE uma técnica de maior eficiência que o HPLC.

(a) (b)

Figura 1.1. Perfil de fluxo gerado por pressão (a), típico na técnica de HPLC e fluxo gerado pelo EOF (b), típico na técnica de CE.

Em condições normais o EOF vai do pólo positivo para o pólo negativo, quando se usa capilares de sílica, vidro ou PTFE.

A grandeza do EOF, ou seja, sua mobilidade (μ_{EOF}) é dependente da viscosidade (η), da permissividade do meio (ε), da permissividade do vácuo (ε_0) e do potencial zeta (ζ). Em termos práticos a mobilidade do EOF é dependente da composição do eletrólito de corrida. A equação 1.5 expressa a μ_{EOF}. De maneira similar aos íons, o EOF adquire uma velocidade de migração v_{EOF} quando um campo elétrico é aplicado ao capilar (equação 1.6).

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\varepsilon_0\zeta}{\eta} \qquad \text{Eq. 1.5}$$

$$v_{EOF} = \mu_{EOF}E \qquad \text{Eq. 1.6}$$

Com a existência do EOF fica claro que a migração das espécies em CE não depende apenas das próprias mobilidades, mas também da mobilidade do EOF. Ao analisarmos um registro de eletroforese capilar, denominado eletroferograma, o tempo que as espécies levam para percorrer um determinado comprimento de capilar é determinado pela sua velocidade aparente (v_{ap}), correspondente a soma das suas velocidades efetivas e a velocidade do EOF, conforme a equação 1.7 demonstra. Cabe ressaltar que o sinal da v_{EOF} é dependente da direção do mesmo, adquirindo um sinal positivo quando tem a mesma direção da v_{ef}, e negativo quando apresenta direção oposta.

$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF} \qquad \text{Eq. 1.7}$$

Fica evidente a importância do EOF nas separações por CE e é interativa a conclusão de que o controle do EOF é uma ferramenta básica no desenvolvimento de métodos utilizando essa técnica. A tabela 1.1 apresenta as variáveis que permitem a modulação do EOF.

Tabela 1.1. formas de modulação do fluxo eletroosmótico[a]

Variável	Efeito
Campo elétrico (*E*)	Promove uma alteração proporcional na v_{ef}. Maiores valores de E promovem, em geral, aumento da eficiência e redução do tempo de análise, porém podem levar ao efeito Joule se a capacidade de dissipação de calor do capilar for ultrapassada.
pH do eletrólito	É sem dúvida a maneira mais simples de modificar a v_{ef}. Atua diretamente na ionização da parede do capilar, e por sua vez no ζ.
Força iônica	A exemplo do pH pode alterar o ζ. Eletrólitos com elevada força iônica promovem a compressão da dupla camada elétrica, reduzindo o ζ e com isso a v_{ef}.
Temperatura	A variação de 1 °C promove uma variação de 2 a 3 % na η da solução, o que afeta a μ_{EOF} e, conseqüentemente a v_{ef}.
Modificadores orgânicos	Alteram a viscosidade e o ζ. Normalmente reduzem a v_{ef}, porém podem ter efeitos complexos na separação.
Surfactantes	Adsorvem na superfície do capilar via interações iônicas e/ou hidrofóbicas. Surfactantes aniônicos podem aumentar a v_{ef}, enquanto surfactantes catiônicos podem reduzir a v_{ef} ou mesmo reverter o sentido do EOF.
Polímeros neutros hidrofílicos	Diminuem a v_{ef} por aumento da η e oclusão da parede do capilar.
Ligações covalentes	Pode-se modificar quimicamente a parede do capilar de diversas formas, o que leva a modificações no EOF, podendo inclusive evitar o mesmo.

(a) Adaptado da referência [8].

Em um eletroferograma é possível determinar a μ_{ef} de uma espécie através do tempo de migração (t) observado, e das equações 1.7 e 1.8. Para que seja possível essa determinação é necessário que se tenha conhecimento do comprimento total do capilar (L), do comprimento efetivo do capilar (l), que corresponde ao comprimento do capilar do ponto de introdução da amostra ao ponto de detecção e do potencial aplicado (V). Além da espécie da qual queremos determinar a μ_{ef}, é necessária a presença de uma espécie neutra que migre apenas conduzida pelo EOF. Essa espécie servirá como marcador de EOF.

$$\mu_{ap} = \frac{lL}{tV} = \frac{l}{tE} \qquad \text{Eq. 1.8}$$

1.4 Modalidades de separações eletroforéticas

Atualmente existem variantes de CE, que, por apresentarem características muito particulares são estudas separadamente e denominadas modos de separação. Neste trabalho foram realizados estudos envolvendo dois modos de separação, a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), também conhecida como eletroforese capilar em zona (CZE) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

A FSCE é, sem dúvida alguma, a modalidade mais utilizada. Nessa modalidade a separação se dá, como o próprio nome sugere, em um eletrólito (normalmente uma solução tampão). O termo CZE vem da forma como ocorre a separação dos analitos, que devido às suas diferenças de mobilidade formam zonas distintas ao longo do capilar até atingirem o detector. A figura 1.2 ilustra esquematicamente uma separação nessa modalidade.

Uma característica interessante da FSCE é que, em determinadas situações, é possível a determinação de espécies aniônicas e catiônicas em uma mesma corrida. Para que isso ocorra é necessário que o EOF possua uma mobilidade maior que as espécies que estejam migrando em sentido oposto. Por exemplo: numa amostra contendo íons e espécies neutras aplicada no pólo positivo, o registro obtido teria como ordem de eluição primeiro os cátions em ordem decrescente de mobilidade, seguidos pelas espécies neutras, e por fim, os ânions, em ordem crescente de mobilidade (porém menor que a mobilidade do EOF). As espécies neutras não são separadas nessa modalidade de CE sem o uso de uma estratégia adequada (ver adiante).

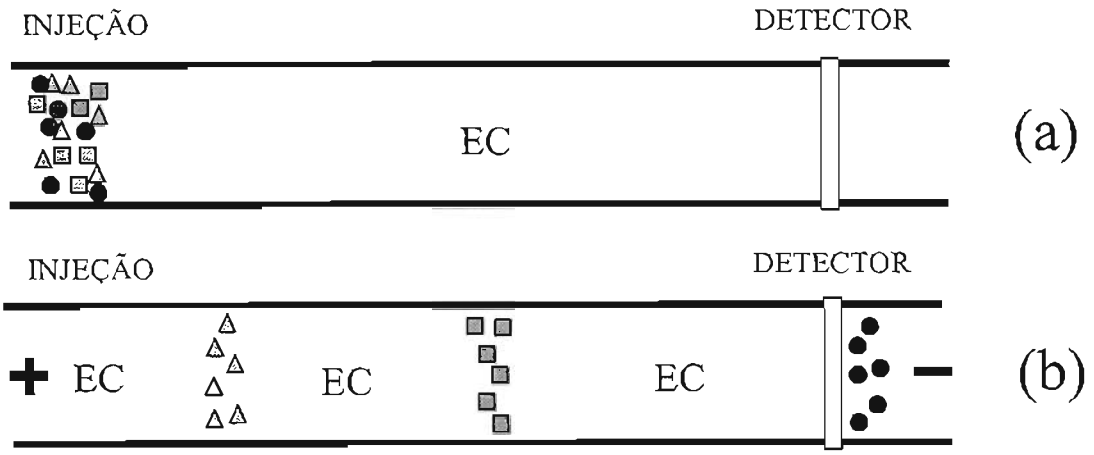


Figura 1.2. Representação esquemática de uma separação por FSCE. Em (a) uma amostra é introduzida no capilar e em (b) observa-se a separação da amostra em zonas distintas de cada analito que migram em direção ao detector sob efeito de um campo elétrico. O capilar é preenchido com um eletrólito de corrida (EC).

A resolução (R) entre dois picos consecutivos (n, n-1) é dada pela equação 1.9 e a eficiência pode ser avaliada pelo número de pratos (N), obtido através da equação 1.10.

$$R_{n,n-1} = 2 \cdot \left(\frac{t_n - t_{n-1}}{W_n + W_{n-1}} \right) \qquad \text{Eq. 1.9}$$

$$N = 5{,}54 \cdot \left(\frac{t_n}{W_{n\,1/2}} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_n}{W_n} \right)^2 \qquad \text{Eq. 1.10}$$

onde t_n, W_n e $W_{n1/2}$ são o tempo de migração e as larguras na linha de base e a meia altura do enésimo pico, respectivamente.

Apesar da simplicidade da FSCE, a separação não é restrita a espécies que naturalmente apresentam diferentes mobilidades eletroforéticas decorrente da possibilidade do uso de aditivos, tais como agentes complexantes, soluções tampão, seletores quirais, surfactantes, modificadores orgânicos, etc. Derivatizações e agentes complexantes são usualmente empregados para conferir carga a espécies neutras, viabilizando a separação por FSCE. As reações de derivatização podem introduzir carga às espécies neutras e ao mesmo tempo aumentar a sensibilidade da detecção, com o uso de grupos cromóforos de alta

absortividade em um dado comprimento de onda (detecção UV-visível) ou com o uso de grupos fluoróforos (detecção fluorimétrica).

Surfactantes catiônicos, com destaque ao brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), são muito utilizados na separação de ânions. Os surfactantes catiônicos adsorvem fortemente na parede do capilar, promovendo uma inversão na carga exposta da dupla camada elétrica, revertendo o sentido do EOF. Essa modificação permite que os ânions migrem no mesmo sentido do EOF, reduzindo o tempo de análise e aumentando a eficiência da separação.

O modo de separação MEKC, introduzido em 1984 por Terabe [9, 10] é um modo importante para a separação de espécies neutras. Esse modo de separação se baseia no uso de eletrólitos contendo um determinado surfactante (ou uma mistura de surfactantes) em uma concentração acima de sua concentração micelar crítica (CMC).

A separação ocorre devido à interação dos analitos com as micelas, que apresentam uma mobilidade (μ_{mc}) menor que a mobilidade do EOF, e são carregadas pelo EOF, que vai em sentido ao detector. Uma espécie, cuja interação com a micela é forte, migra mais lentamente que uma espécie mais hidrofílica. O mecanismo é muito semelhante a separação em HPLC, com a ressalva que nesse caso não temos uma fase estacionária, pois as próprias micelas são eluídas na extremidade do detector. Também chamamos a fase micelar de fase pseudo-estacionária. A implicação imediata é que, de forma distinta ao HPLC, a janela temporal, ou intervalo de eluição, é finita. O parâmetro que representa a afinidade de uma dada substância pela micela é o fator de capacidade (k), obtido através de equação 1.11. Observe que o k de uma espécie que não sofre qualquer interação com a micela é zero.

$$k = \frac{t_m - t_0}{t_0 \cdot \left(1 - \frac{t_m}{t_{mc}}\right)} \qquad \text{Eq. 1.11}$$

onde t_m t_0 e t_{mc} são, respectivamente, os tempos de migração do analito, do EOF e das micelas.

É possível determinar o intervalo de eluição em MEKC, bastando efetuar uma corrida de uma amostra contendo uma espécie que não interaja com as micelas (um marcador de t_0) e uma espécie que não interaja com o meio aquoso (um marcador de t_{mc}). A figura 1.3 representa uma separação por MEKC. A figura 1.4 representa a janela de eluição característica de MEKC.

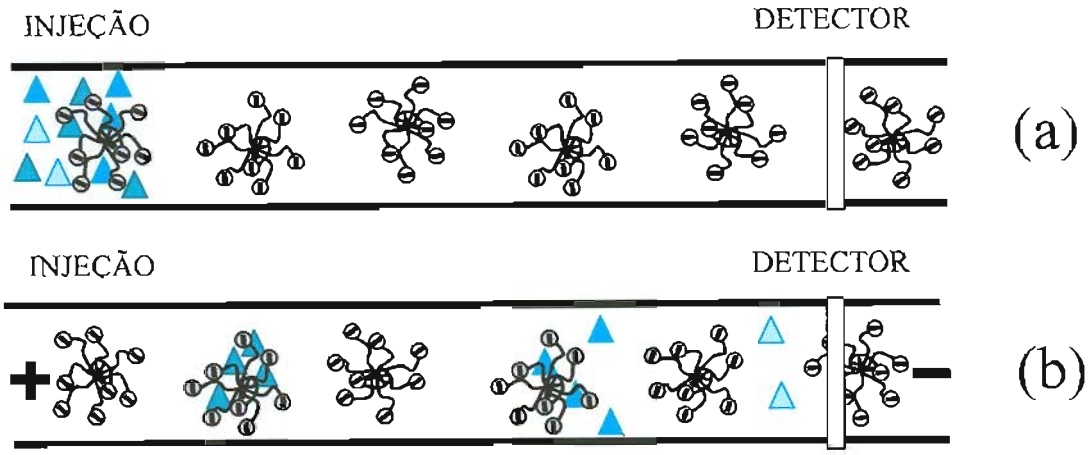


Figura 1.3. Representação esquemática de uma separação por MEKC. Em (a) uma amostra é introduzida no capilar e em (b) observa-se a separação da amostra de acordo com a polaridade de cada soluto. O tom dos solutos representa a polaridade, onde tons mais claros correspondem à maior polaridade (mais hidrofílicos). Os solutos são separados pelas diferenças de polaridade.

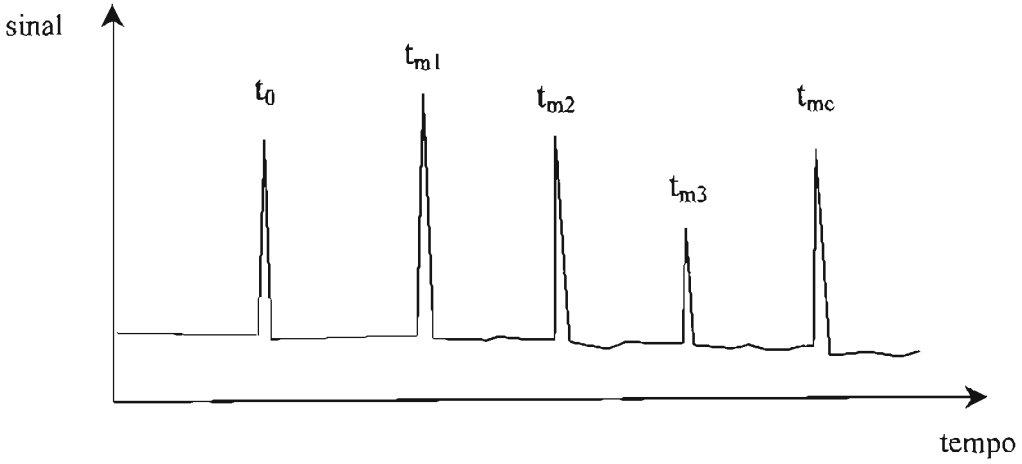


Figura 1.4. Representação de um eletroferograma em uma separação por MEKC. A janela de eluição corresponde ao intervalo temporal compreendido entre os tempos de migração do EOF e das micelas, t_0 e t_{mc}, respectivamente. As espécies t_{m1}, t_{m2} e t_{m3} representam três solutos separados conforme seu caráter hidrofílico ($t_{m1} > t_{m2} > t_{m3}$).

Além dos modos de separação FSCE e MEKC, os outros modos de CE mais importantes são a eletroforese capilar em gel (CGE), eletroforese capilar de focalização isoelétrica (CIEF) e a isotacoforese capilar (CITP) [11].

A CGE tem maior aplicação na separação de macromoléculas, principalmente de interesse bioquímico, como ácidos nucléicos e proteínas. Nesse modo as espécies são separadas por tamanho, através de um capilar preenchido com um polímero. As espécies menores apresentam menor dificuldade para atravessar os polímeros, de forma a serem as mais velozes nesse sistema e as primeiras a serem eluídas.

A CIEF também tem grande aplicação na bioquímica. Aplica-se esse modo para a separação de substâncias anfotéricas, principalmente peptídeos e proteínas, de acordo com seus respectivos pontos isoelétricos (PI), que correspondem a um determinado pH onde a carga líquida do composto é zero. Para se realizar a separação por CIEF é constituído um gradiente de pH ao longo do capilar através de uma mistura de compostos anfotéricos (anfólitos).

O capilar é preenchido com a mistura de anfólitos, já contendo a amostra, enquanto o reservatório catódico é preenchido com uma solução de pH superior ao PI do anfólito mais básico e, de maneira semelhante, o reservatório anódico é preenchidos com uma solução de pH inferior ao PI do anfólito mais ácido. Ao se aplicar o potencial de separação, os anfólitos irão migrar ao longo do capilar até atingirem seu PI, onde permanecerão estacionados. O resultado é a geração de bandas distintas focalizadas. O gradiente de pH formado depende do número de anfólitos e da distribuição de seus PIs. Uma vez focalizados, os solutos são eluídos através de pressão (mobilização hidrodinâmica) ou pela substituição de um dos reservatórios por uma solução salina (mobilização eletroforética).

Na CITP, a amostra é inserida entre dois eletrólitos diferentes, denominados terminador e líder. Esse modo de separação permite a separação de cátions e ânions, porém em análises distintas. Dessa forma temos a CITP catiônica, onde o cátion do eletrólito líder deve ter uma mobilidade maior do que qualquer cátion da amostra, enquanto o cátion terminador deve ter mobilidade menor que qualquer cátion da amostra. O mesmo conceito é aplicado aos ânions, constituindo a CITP aniônica. Espécies que não respeitam essa condição não são separadas.

Com o estabelecimento de um campo elétrico (E) o processo de separação é iniciado. As espécies formam bandas bem definidas e adjacentes, organizadas por ordem de mobilidade. Os íons líder e terminador são as espécies encontradas nas extremidades do plug de amostra. Além do efeito de focalização existe um efeito extremamente importante e

fundamental em CITP: as bandas migram a uma mesma velocidade, denominada velocidade isotacoforética v_{itp}, o que implica no surgimento de campos elétricos diferentes para banda de cada íon, mantendo a validade da equação 1.4, que pode ser reescrita para a CITP como a equação 1.12.

$$v_{itp} = \mu_L E_L = \mu_{S1} E_{S1} = \mu_{S2} E_{S2} = \mu_{Sn} E_{Sn} = \mu_T E_T \quad \text{Eq. 1.12}$$

onde a equação descreve a v_{itp} dos eletrólitos líder e terminador e de solutos (índices L, T e S, respectivamente).

O registro observado em CITP normalmente difere dos registros observados nas outras modalidades de eletroforese. Apesar da detecção espectrofotométrica ser aplicável, o modo de detecção mais comum nesse modo de separação é o condutométrico, que apresenta degraus correspondentes a condutividade de cada banda. O degrau de maior altura é o correspondente ao eletrólito terminador. A quantificação não é feita pela área, nem pela altura, mas sim pela largura do degrau. A informação quantitativa pode ser obtida dessa forma porque, no decorrer da separação, surge um estado de equilíbrio (quando as bandas estão separadas e migrando por ordem de mobilidade). Nessa situação todas as bandas apresentam a mesma concentração do eletrólito líder, o que resulta em bandas comprimidas para os solutos presentes em baixa concentração e bandas largas para solutos presentes em elevada concentração.

1.5 Sistemas de detecção

Um dos pontos mais importantes para a maior parte das técnicas instrumentais é o sistema de detecção empregado para a determinação de uma dada espécie. O sistema de detecção determina qual o tipo de espécie poderá ser "enxergada" pelo detector e também quão sensível será a determinação. Dessa forma, a discussão relativa a detecção é norteada por dois aspectos: seletividade e sensibilidade.

Detectores considerados pouco seletivos baseiam-se em características comuns às espécies que se pretende determinar. São detectores interessantes principalmente quando a separação das espécies é completa, permitindo assim a determinação de todas as espécies.

Os detectores mais seletivos baseiam-se em características físico-químicas que não são semelhantes em todas as espécies. Um sistema de detecção seletivo é particularmente

interessante nos casos em que a separação total das espécies contidas na amostra é muito difícil de se obter. Não há necessidade da separação entre a espécie de interesse e outras espécies que não são detectáveis no sistema utilizado. A tabela 1.2 apresenta valores típicos de limites de detecção (LOD) para alguns dos sistemas de detecção mais utilizados em CE [12].

Tabela 1.2. Faixa típica de LOD para sistemas de detecção aplicados em CE.

Modo de detecção	LOD / $mol.L^{-1}$
Índice de refração (laser)	10^{-5} - 10^{-6}
Absorção no UV-visível	
direta	10^{-5} - 10^{-6}
indireta	10^{-4} - 10^{-5}
Fluorescência	
direta (lâmpada)	10^{-7} - 10^{-8}
direta (laser)	10^{-9} - 10^{-12}
indireta	10^{-6} - 10^{-7}
Amperometria	10^{-8} - 10^{-9}
Condutividade	10^{-5} - 10^{-6}
Raman	10^{-6} - 10^{-7}
Radiometria	10^{-9} - 10^{-11}
Espectrometria de massas	10^{-4} - 10^{-9}

Algumas considerações podem ser feitas a respeito dos métodos de detecção listados na tabela 1.2: os métodos de detecção baseados em fluorescência, apesar de sensíveis, freqüentemente requerem derivatizações, além de representar um detector caro. A amperometria é um método sensível e apresenta boa seletividade, porém fica limitada a elementos eletroativos e requer modificações no capilar. Sem dúvida, espectrometria de massas concilia uma boa sensibilidade e traz informações estruturais, porém o eletrólito deve ser ajustado para esse tipo de detecção. Os métodos baseados na absorção no UV-visível e baseados em medidas de condutividade são os menos seletivos, e podem inclusive ser considerados universais. A exemplo da detecção amperométrica, a detecção condutométrica requer modificações no capilar. A detecção condutométrica sem contato (CCD) é uma variante da detecção condutométrica convencional, e será abordada em maiores detalhes.

1.6 Detecção condutométrica sem contato

Conforme já mencionado, os detectores condutométricos convencionais requerem modificações no capilar para posicionamento dos eletrodos. Estratégias como a perfuração do capilar com um laser de CO_2 [13] ou o posicionamento de eletrodos na extremidade do capilar [14, 15] foram utilizadas para efetuar esse tipo de detecção, porém não são procedimentos simples e rápidos. Uma vantagem imediata da CCD é a simplicidade para posicionamento do capilar no detector, mais simples, inclusive, que para a detecção baseada em métodos espectrofotométricos, onde há a necessidade de remover uma parte do recobrimento de poliimida dos capilares de sílica fundida para possibilitar a transmissão de luz. Como os eletrodos não estão imersos na solução, fenômenos de envenenamento são evitados, e também se evita que os eletrodos sofram uma ação direta do campo elétrico de separação, o que favorece a relação sinal/ruído (SNR).

Em CCD o capilar é inserido em dois eletrodos metálicos cilíndricos, de 2 mm de comprimento, espaçados por 1 mm, conforme pode ser observado na figura 1.5, onde temos uma representação da cela condutométrica (1.5a) e uma representação simplificada do circuito elétrico equivalente (1.5b).

A um dos eletrodos é aplicado um sinal senoidal, com uma freqüência da ordem de centenas de kHz, o que difere bastante das freqüências aplicadas em detectores condutométricos convencionais, nos quais aplicam-se, tipicamente, algumas unidades de kHz. Em virtude da freqüência utilizada, uma corrente elétrica proporcional à condutividade da solução irá fluir entre os eletrodos. Essa corrente é convertida em tensão alternada, com posteriores etapas de retificação e amplificação, e através de uma placa conversora analógico-digital gera um registro que pode ser interpretado e trabalhado através de programas de computadores, como por exemplo o Origin™.

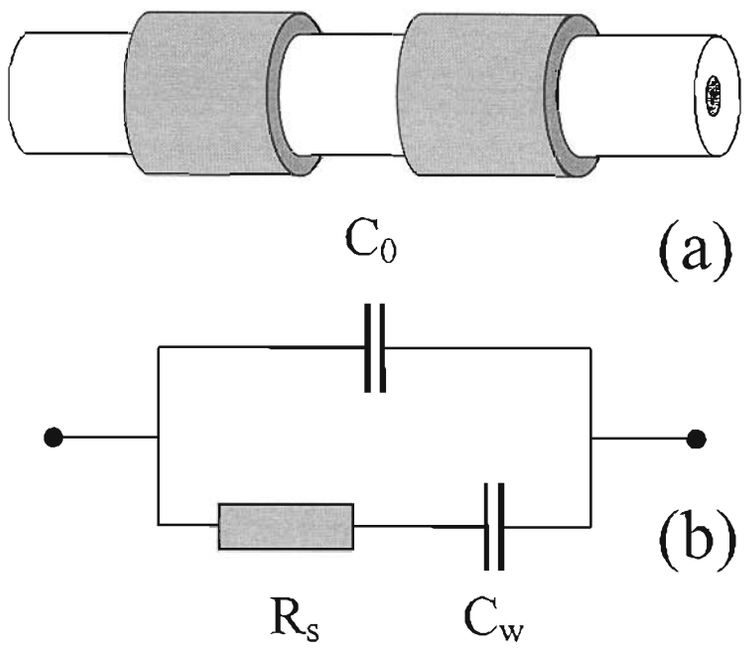


Figura 1.5. Representação da cela de CCD, formada por um capilar e dois eletrodos metálicos (a) e do seu respectivo circuito equivalente (b), onde temos representadas as capacitâncias da parede do capilar (C_w) e intereletrodos (C_0), e a resistência da solução (R_s).

O surgimento de uma corrente elétrica mesmo sem contato com a solução pode ser entendido através da análise do circuito elétrico apresentado na figura 1.5b.

O capacitor C_0 é correspondente à transmissão de sinal entre os próprios eletrodos, enquanto o capacitor C_w pode ser considerado como a associação em série de dois capacitores formados pela parede do capilar (dielétrico) e entre os eletrodos e a solução. A resistência R_s corresponde à resistência da solução na região do detector.

Quando freqüências baixas são aplicadas ao circuito, as reatâncias capacitivas, Xc_0 e Xc_w, tornam-se elevadas, o que faz com que o circuito se resuma ao circuito R_sC_w série. Em circuitos RC em série, se aplicarmos um potencial contínuo ou alternado de freqüência baixa (dependente do valor da capacitância do capacitor) não ocorre condução significativa, e o valor da resistência passa a ser irrelevante.

Por outro lado, com o aumento da freqüência aplicada, as reatâncias capacitivas assumem valores cada vez menores, quando o comportamento passa a ser do circuito R_sC_0 paralelo. Para freqüências muito elevadas, a passagem de corrente pelo elemento capacitivo é tão favorecida que a resistência passa a ser novamente irrelevante para a determinação da corrente que percorre o circuito.

Conclusão: existe uma freqüência ótima de trabalho, onde a resistência da solução é relevante e pode ser determinada através da corrente que flui entre os eletrodos [16].

O mecanismo da detecção de espécies em CCD, operando em FSCE, é baseado na substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito ocorre um aumento da condutividade nessa região, o leva ao registro de um pico positivo. Existe também a possibilidade de detecção condutométrica indireta, onde o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, resultando em picos negativos. Quanto maior a diferença entre as mobilidades, maior a sensibilidade obtida.

Portanto, em CCD a escolha do eletrólito é importante não só para possibilitar a separação, mas também está diretamente relacionada com a sensibilidade obtida na determinação de cada analito.

1.7. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram estudar a separação e determinação de espécies não-iônicas utilizando CCD, assim como estudar o mecanismo relacionado à detecção dessas espécies quando separadas por MEKC.

Procuramos também ampliar a gama de espécies determinadas por CE com CCD, uma vez que a maior parte dos estudos até a presente data havia sido focada na determinação de íons inorgânicos (principalmente) e pequenos ânions orgânicos.

Capítulo 2

Detecção de álcoois alifáticos

2.1 Introdução

A escolha da CE para separação de espécies iônicas é uma escolha natural. Trata-se de uma técnica criada e desenvolvida baseada na mobilidade iônica das espécies. No entanto, outra característica marcante dessa técnica é sua versatilidade. Com o surgimento do modo de separação MEKC [9, 10], criou-se uma nova abordagem para a separação de espécies neutras.

Inúmeras determinações têm sido realizadas por MEKC, o que confere um grande destaque para esse modo de separação. Recentemente verificou-se a possibilidade do uso da CCD em MEKC na separação de álcoois alifáticos [17]. Entretanto, os mecanismos que permitem a detecção não são óbvios, uma vez que o mecanismo relacionado a detecção de íons em FSCE (capítulo 1) não pode ser diretamente aplicado a esse modo de separação.

Apesar da CE não ser exatamente a técnica de escolha para a determinação de álcoois alifáticos, é particularmente interessante o uso dessa classe de substância para a condução de estudos no sentido de elucidar o mecanismo de detecção condutométrica de espécies neutras em MECK. Álcoois alifáticos são utilizados como co-surfactantes em meios micelares e, portanto, existe uma boa literatura disponível tratando do comportamento desses em sistemas micelares.

2.2 Material e métodos

Soluções e capilares. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As soluções foram preparadas através da dissolução direta desses reagentes ou através da diluição de soluções estoque. Em ambos os casos, foi utilizada água deionizada, com resistividade elétrica maior ou igual a 18 MΩ (Nanopure UV, Barnsted).

Os capilares utilizados (J&W Scientifc) eram de sílica fundida, com 375 μm de d.e., 50 μm de d.i. (exceto quando indicado) e de comprimentos variáveis. O condicionamento foi realizado através de uma seqüência de lavagens de aproximadamente 15 min para cada fluido: água - NaOH 0,5 mol L^{-1} - água – eletrólito. Antes da primeira injeção, o potencial de separação era aplicado por aproximadamente 20 min ou até a estabilização da linha base. Entre as corridas, o capilar foi submetido a um *flush* de cerca de 20 s com o eletrólito de corrida.

A introdução das amostras, diluídas com o eletrólito de corrida, foi sempre realizada de forma hidrodinâmica pela elevação do reservatório do ânodo ou do cátodo para MEKC com surfactantes aniônicos ou catiônicos, respectivamente.

Equipamento de CE. O equipamento de CE utilizado foi construído no próprio laboratório [16, 18, 19]. Este equipamento é composto por:

- Um gabinete de acrílico, responsável pelo isolamento térmico e elétrico do sistema;
- Um sistema de termostatização composto por duas ventoinhas uma resistência elétrica e um trocador de calor. O controle desse sistema é eletrônico, permitindo a manutenção de uma temperatura constante e superior a temperatura ambiente;
- Uma fonte de alta tensão responsável pela aplicação do potencial elétrico tanto para as separações como para a injeção eletrocinética de amostras. Essa fonte permite a aplicação de – 29 kV a + 29 kV;
- Um mecanismo elevador, adaptado de uma impressora matricial, responsável pela injeção hidrodinâmica de amostras;
- Dois Eletrodos de platina para aplicação do potencial de separação e dois suportes para os reservatórios (vials de 1,5 mL, do tipo Eppendorf) de eletrólito e amostra;
- Um gerador de sinais (FG-2002C, Goldstar), responsável pela aplicação do sinal no detector;
- Um Detector condutométrico sem contato (CCD) [18, 19], capaz de operar até cerca de 1 MHz;
- Um computador interfaceado, responsável pela aquisição dos dados.

Todos os experimentos de CE foram realizados utilizando um sinal 600 kHz e 2,0 V_{pp} aplicado ao CCD. A temperatura no interior do gabinete foi mantida em aproximadamente 30 °C.

Os registros eram armazenados como um documento ASCII. O tratamento dos dados foi feito através do programa Origin 5.0 (Microcal).

Medidas de viscosidade. As medidas de viscosidade foram obtidas com o uso de viscosímetro de Ostwald. Os escoamentos das soluções foram realizados a uma temperatura de 25 °C, com o auxílio de um banho termostatizado (9105 PolySience). As medidas foram realizadas em triplicata. Como referência, o tempo de escoamento da água foi determinado, e através do respectivo valor tabelado foram obtidos os valores de viscosidade para o eletrólito (tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 7 e SDS 50 mmol L^{-1}), e para o eletrólito contendo

2 μL mL^{-1} de 3-pentanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-metil-2-butanol e 2-meti-1-butanol, em um total de 6 soluções diferentes.

Os valores de densidade necessários para a determinação da viscosidade foram obtidos através da pesagem em triplicata da massa de um volume de 25 mL. Foram determinadas as densidades da água, do eletrólito e do eletrólito contendo 2 μL mL^{-1} de 3-pentanol e 2-pentanol. Adotou-se a mesma densidade para todos os sistemas contendo álcoois, uma vez que o valor encontrado para o 3-pentanol e o 2-pentanol foi idêntico considerando-se o erro experimental.

Medidas de condutividade. As medidas de condutividade empregaram um condutivímetro de fabricação própria [20], operando a 2 kHz. Esse condutivímetro gera um potencial elétrico proporcional à condutividade da solução, que é medidos com um multímetro. No experimento em questão foi utilizado um multímetro com resolução de 0,1 mV (HP3478A Hewlett Packard).

As medidas foram realizadas em uma cuba de vidro encamisada, coberta com uma tampa de isopor a fim de isolar o sistema, possibilitando a termostatização com a circulação de água (9105 PolySience). A temperatura foi monitorada por um termômetro digital (LF Equipamentos e Serviços).

Os experimentos realizados mediram a variação de condutividade promovida pela adição de álcoois alifáticos a diferentes soluções: tampão fosfato de sódio, pH 6,9, 50 mmol L^{-1}; tampão fosfato de sódio, pH 6,9 50 mmol L^{-1} diluído em 10% com metanol; tampão fosfato de sódio, pH 6,9, 50 mmol L^{-1} mais SDS 50 mmol L^{-1}; tampão fosfato de sódio, pH 6,9, 50 mmol L^{-1} mais SDS 50 mmol L^{-1} diluído em 10% com metanol. De cada solução, uma alíquota de 50 mL era passada para a cuba e, após se atingir o equilíbrio térmico (30 °C ou 25 °C), foram feitas as medidas de variação da condutividade em resposta a sucessivas adições do álcool em teste, num total de dez adições de 100 μL de cada álcool em cada solução.

A conversão do potencial obtido, em mV, para condutividade, em μS cm^{-1}, foi realizada através da calibração do condutivímetro, dada pela leitura de soluções 0,1 mol L^{-1} e 0,01 mol L^{-1}de KCl, a 25 °C, cujo valor da condutividade dessas soluções é disponível em literatura [21].

Medidas de admitância. As medidas de admitância foram realizadas em uma cela capacitiva encamisada construída em acrílico e aço inox para essa finalidade. O experimento foi realizado a 30 °C com a circulação de água. O equipamento responsável pelos espectros de admitância foi um analisador de impedâncias (HP4194A, Hewlett Packard).

Foi verificada a influência do etanol e do 3-pentanol na admitância da solução tampão fosfato de sódio, pH 6,9, 50 mmol L^{-1} mais SDS 50 mmol L^{-1}, para um intervalo de 100 Hz a 100 MHz.

2.3 Resultados e discussão

Utilizando a montagem descrita em materiais e métodos, diversas medidas de condutividade foram efetuadas, procurando extrapolar os resultados observados para MEKC. As condições dos testes de condutividade foram escolhidas para avaliar justamente os resultados já obtidos em MEKC com CCD [17].

Observamos que a adição de álcoois ao tampão fosfato de sódio promove redução da condutividade, com uma ligeira tendência dos álcoois de maior cadeia orgânica provocarem um maior decréscimo. A figura 2.1 mostra o comportamento da condutividade de soluções não-micelares com a adição de álcoois.

É particularmente interessante notar (figura 2.1.b) que mesmo uma solução contendo 10 % de metanol sofre alteração com a adição de reduzidas quantidades do próprio metanol. O aumento da viscosidade do meio, somado a possíveis mudanças na solvatação das espécies iônicas, pode explicar a redução de condutividade observada.

Em meios micelares são observadas diferenças significativas da condutividade conforme o tamanho da cadeia carbônica e, por conseqüência, de polaridade. A figura 2.2 mostra essas alterações. O fato mais intrigante é que a adição de 1-pentanol é capaz de aumentar a condutividade do meio, o que, de certa forma, é conflitante com os resultados obtidos em MEKC, onde todos os álcoois são detectados de forma indireta, ou seja, como picos negativos.

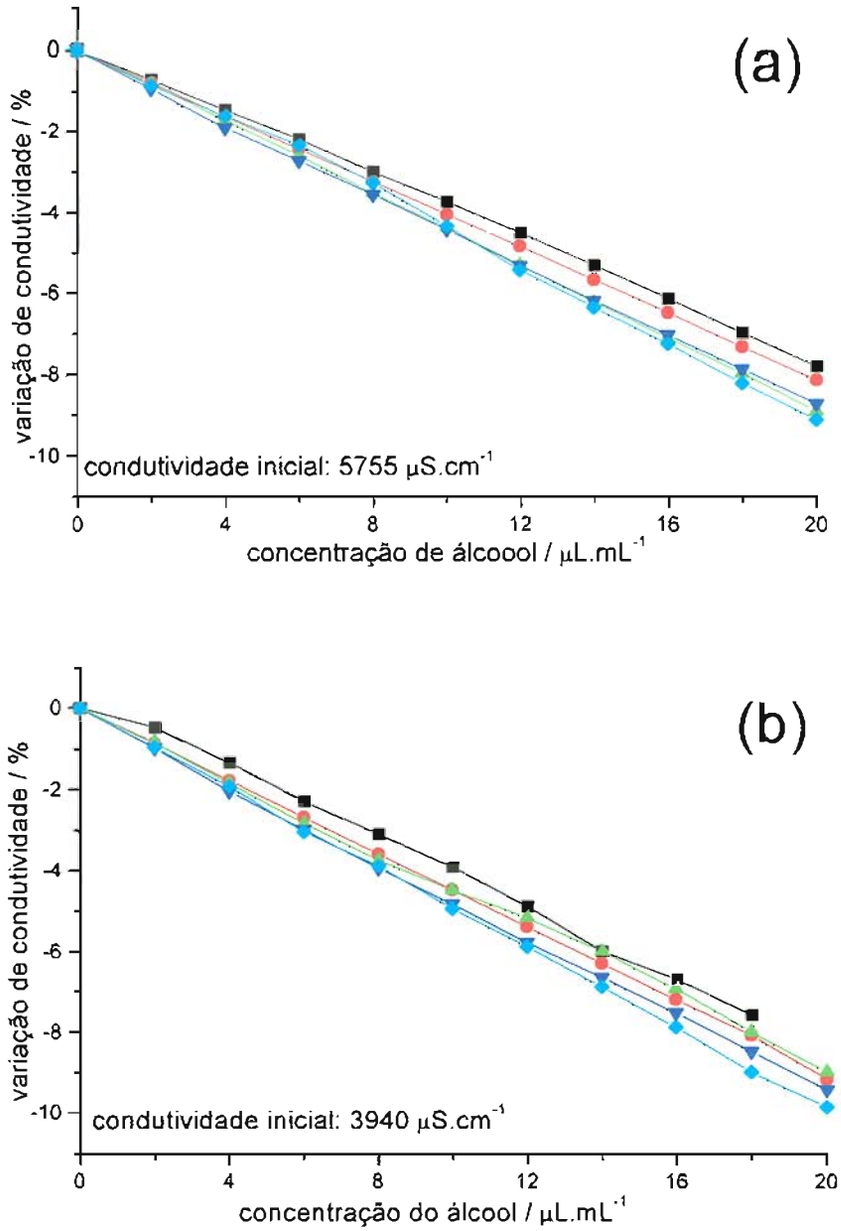


Figura 2.1. Variação da condutividade promovida pela a adição de álcoois alifáticos a 50 mL da solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9 **(a)** e a solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9, diluída com 10 % de metanol **(b)**. Cada ponto representa a adição de 100 μL de (—■—) metanol, (—●—) etanol, (—▲—) 2-propanol, (—▼—) 1-butanol, (—◆—) 3-pentanol. Temperatura 30 °C.

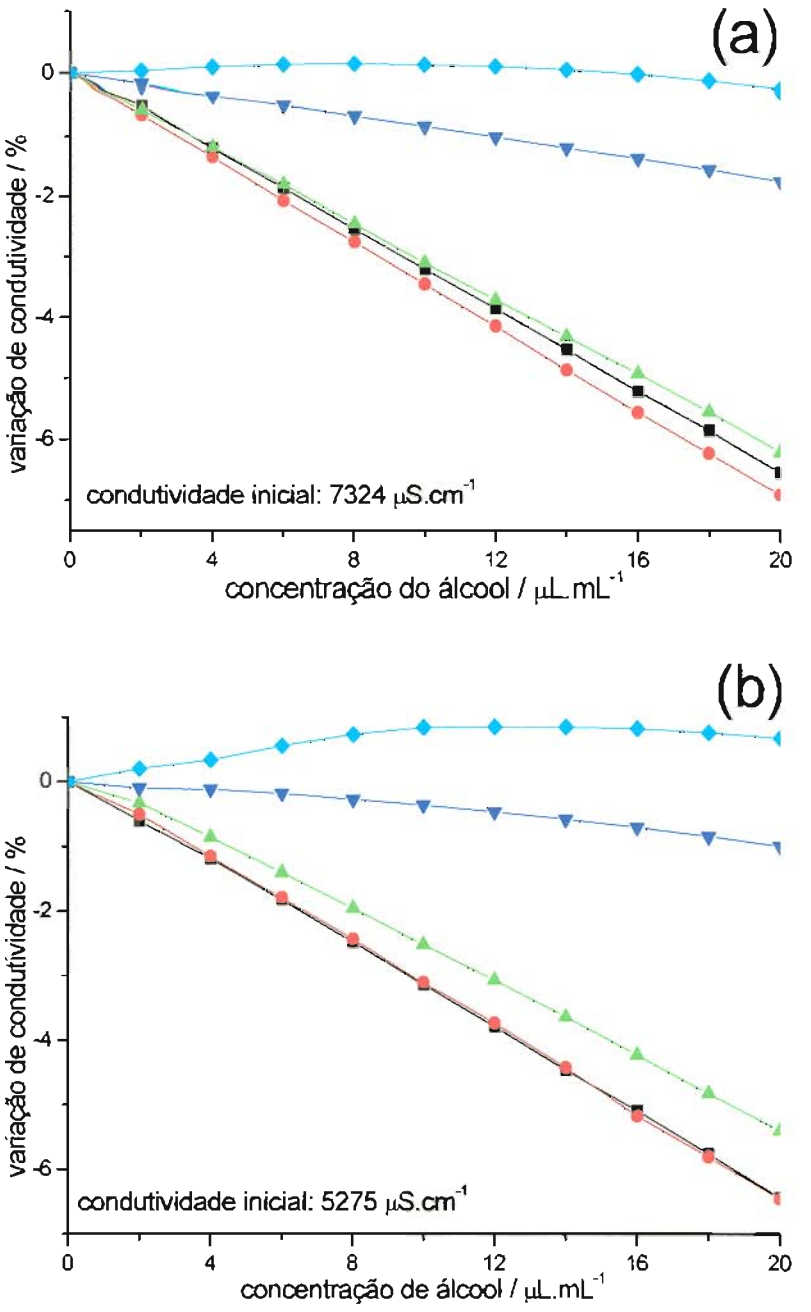


Figura 2.2. Variação da condutividade promovida pela a adição de álcoois alifáticos a 50 mL da solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9 mais SDS 50 mmol L^{-1} **(a)** e a solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9 mais SDS 50 mmol L^{-1} diluída com 10 % de metanol **(b)**. Cada ponto representa a adição de 100 μL de (—■—) metanol, (—●—) etanol, (—▲—) 2-propanol, (—▼—) 1-butanol, (—◆—) 3-pentanol. Temperatura 30 °C.

As micelas carregam consigo parte dos contraíons, pois acima da CMC a ionização é apenas parcial (cerca de 70 %, para SDS em água). Portanto o número de agregação, ou seja, o número de monômeros de surfactante em cada micela não corresponde a carga líquida dessa micela [22, 23, 24]. O aumento de condutividade em soluções de surfactantes, em concentrações superiores a CMC, deve-se principalmente a uma redução na densidade de carga na superfície da micela, que permite uma melhor acomodação dos grupos sulfato, liberando o contra-íon (no caso o sódio) para a solução.

Quanto menor a concentração de surfactante, maior a fração de monômeros livres no meio aquoso (esses completamente ionizados). Aumentando a concentração do surfactante, e ultrapassada a CMC, começa a ocorrer a diminuição da fração de surfactante livre, e a aumentar o número de agregação das micelas. No entanto, os contra-íons tornam-se apenas parcialmente ionizados.

Quando n-álcoois (com uma cadeia de quatro ou mais carbonos) são adicionados a soluções de SDS com valores ligeiramente inferiores a CMC, ocorre a micelização, o que corresponde à propriedade depressora de CMC [22]. Portanto os álcoois podem diminuir a condutividade do meio por favorecer a micelização, reduzindo assim os monômeros livres, ou aumentar a condutividade do meio promovendo a liberação do contra-íon da superfície da micela. O efeito é dependente da concentração do álcool, da concentração do surfactante e do tamanho da cadeia alifática do álcool [22, 23].

Em síntese, quando adicionados a soluções com uma concentração logo acima da CMC, os álcoois com cadeia com até quatro carbonos produzem decréscimo da condutividade. Quando álcoois com mais de quatro carbonos são adicionados a soluções com maior concentração de SDS, o efeito é o aumento da condutividade devido à ionização das micelas. Quanto maior a afinidade do álcool pela micela, maior o efeito. Como a separação em MEKC baseia-se na diferença de polaridade dos solutos, existe uma correlação direta entre a ordem de eluição e a variação de condutividade que um álcool promove no meio micelar, o que pode ser comprovado através da figura 2.3.

Esse experimento, envolvendo a adição de uma série de pentanóis, confirmou a tendência inicialmente observada: quanto menos ramificado (mais apolar) o álcool, maior o aumento de condutividade. Álcoois com um número intermediário de carbonos atuam como co-surfactantes em sistemas micelares.

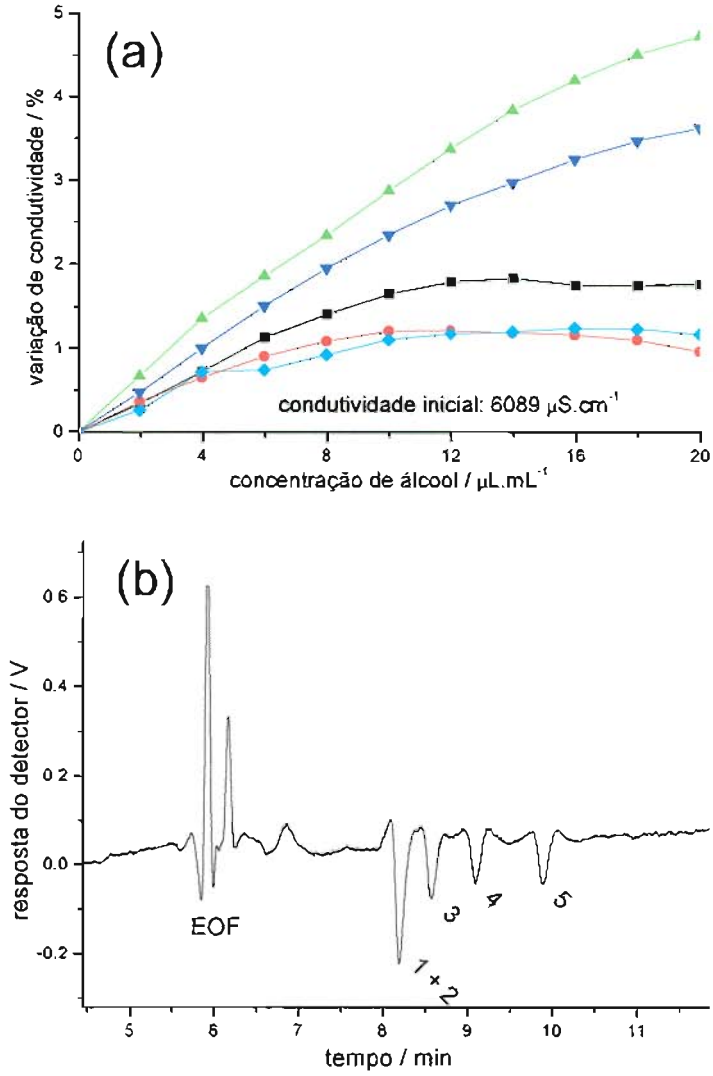
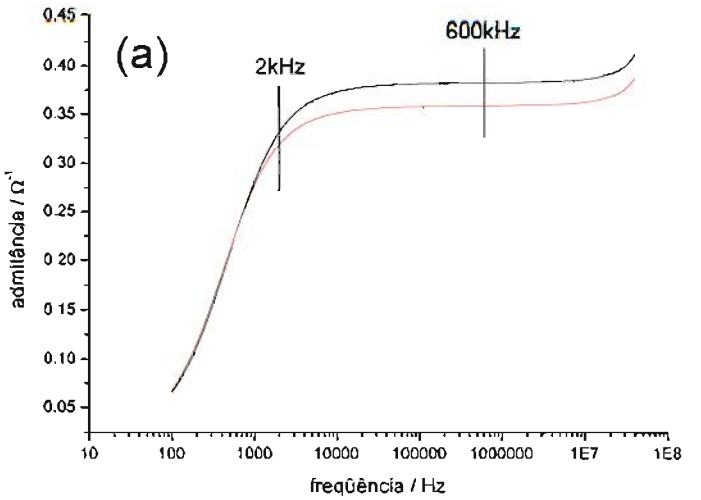


Figura 2.3. **(a)** Variação da condutividade da solução (tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9 mais SDS 50 mmol L^{-1} (diluído com 10% de metanol), promovida pela a adição de álcoois alifáticos. Cada ponto representa a adição de 100 µL de (—●—) 3-pentanol, (—◆—) 3-metil-2-butanol, (—■—) 2-pentanol, (—▼—) 2-metil-1-butanol, (—▲—) 1-pentanol. Temperatura 25 °C. **(b)** Eletroferograma obtido com o mesmo eletrólito, capilar de 43 cm (33 cm efetivos), potencial aplicado 11 kV, injeção hidrodinâmica 10 cm, 20 s. Picos: 3-pentanol e 3-metil-2-butanol (1 + 2), 2-pentanol (3), 2-metil-1-butanol (4), 1-pentanol (5), todos 1,5 µl mL^{-1} (aproximadamente 13,9 mmol L^{-1}).

As freqüências de operação do condutivímetro e do CCD são 2 kHz e 600 kHz, respectivamente. Para avaliar a hipótese da resposta contrária da condutividade na presença de álcoois, foram efetuadas medidas de admitância em um analisador de impedâncias. Esse equipamento permite a medida de admitância numa faixa abrangente de freqüências, inclusive as utilizadas para medidas convencionais de condutividade e a CCD empregada em CE.

A figura 2.4 corresponde aos testes de admitância, realizados com etanol e 3-pentanol. O teste desses dois álcoois em sistema contendo tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9 e SDS 50 mmol L^{-1} foi suficiente para concluir que a presença de picos negativos não é um artefato de leituras de condutividade a elevadas freqüências. Como se pode observar, os resultados são concordantes com os resultados dos experimentos de condutividade: o etanol leva a uma queda da admitância, enquanto o 3-pentanol leva ao aumento da admitância, tanto em 2 kHz como em 600 kHz. O ângulo de fase observado também demonstrou um comportamento resistivo.



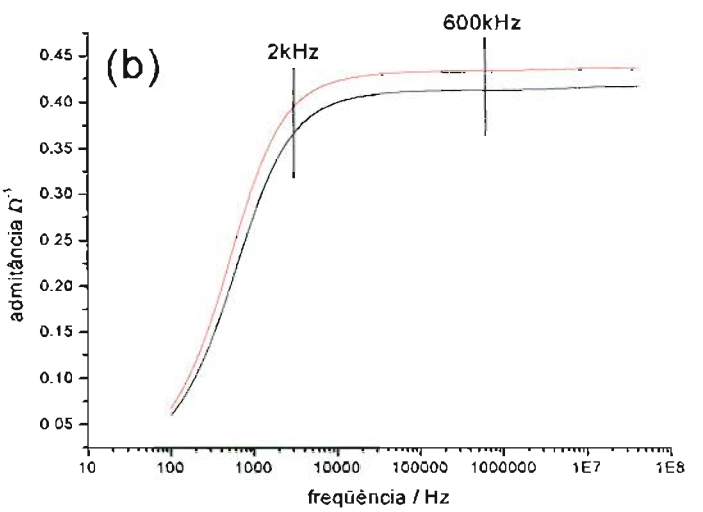


Figura 2.4. Espectro da admitância (módulo) antes e após a adição de 2,6 % de etanol **(a)** e de 2,6 % de 3-pentanol **(b)** a uma solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9, SDS 50 mmol L^{-1}. Em ambas a linha preta corresponde à solução antes da adição do respectivo álcool.

Como a adição de álcoois altera a viscosidade das soluções micelares, realizamos medidas de viscosidade envolvendo a série de pentanóis separadas por MEKC. Com o estudo de viscosidade, testamos se as alterações de viscosidade provocada pelos diferentes álcoois (no caso pentanóis) poderiam trazer alguma informação adicional.

Diferentemente do que observamos nos estudos de condutividade, as medidas de viscosidade não demonstraram ter relação evidente com a ordem de eluição de cada álcool. Apesar de particionarem com proporções diferentes com as micelas, a viscosidade sofre praticamente a mesma alteração com a adição de qualquer um dos álcoois testados. Assim, a alteração de viscosidade demonstrou não ser determinante para a sensibilidade observada anteriormente [17]. A tabela 2.1 traz os valores de viscosidade e os valores de densidade, determinados para o cálculo da viscosidade.

Tabela 2.1. Comparativo entre as viscosidades de soluções micelares contendo álcoois.

Solução	Densidade [a]	Viscosidade[b]
Água	0,9944	0,891[d]
Tampão	1,0025	0,964
1-pentanol[e]	0,9993	1,043
2-pentanol[e]	0,9992	1,047
3-pentanol[e]	0,9993[c]	1,049
2-metil-1-butanol[e]	0,9993[c]	1,039
3-metil-2-butanol[e]	0,9993[c]	1,045

(a) densidade em g mL^{-1}, $\sigma = 0,0013$.
(b) viscosidade em kg m^{-1} s^{-1}, $\sigma = 0,001$
(c) valores adotados (valor obtido para o 3-pentanol)
(d) valor tabelado
(e) referente ao eletrólito tampão fosfato de sódio pH 7 / SDS 50 mmol L^{-1} contendo 2 μg mL^{-1} do respectivo álcool

A resposta observada em MEKC com CCD demonstra-se complexa, dependente de diversos fatores. Acreditamos que a resposta seja, em parte, composta por efeitos de viscosidade e solvatação das espécies do tampão, porém, apenas essas variáveis não seriam capazes de explicar o porquê encontramos sempre picos negativos, mesmo quando o álcool em questão promove aumento de condutividade das soluções micelares. Nossa hipótese é que em condições de CE a modulação do tamanho e, principalmente, a ionização das micelas provoque situações de empobrecimento de espécies na solução

junto ao plug dos álcoois. Portanto, os picos observados seriam resultantes de um espalhamento das espécies das micelas e contra-íons ionizados por ação dos álcoois, resultando em vacâncias detectáveis por CCD.

Apesar de motivadora, a comprovação do mecanismo provavelmente tomaria um tempo incompatível com o prazo disponível para a conclusão do presente projeto. A confirmação da hipótese levantada dependeria um tempo demasiadamente grande, com a necessidade de uma abordagem experimental totalmente diferente da inicialmente planejada, inclusive através de simulações computacionais.

Diante dessa circunstância, optamos por contemplar os demais objetivos do estudo, ou seja, aplicações da CE com CCD para determinação de espécies não iônicas. Estendemos os estudos da separação e detecção de álcoois alifáticos, de onde já possuíamos um ponto de partida [17], e realizamos o estudo da separação de polióis (mais especificamente carboidratos) e de um fármaco (salbutamol), uma substância que permitiu a comparação da performance da CCD entre os modos de separação FSCE e MEKC. Apenas os estudos referentes aos álcoois serão tratados neste capítulo. Os capítulos 3 e 4 tratam dos estudos com carboidratos e com salbutamol, respectivamente.

Avaliamos o efeito causado pela variação da concentração de surfactante, concentração do tampão e uso de modificadores orgânicos na separação e detecção de álcoois alifáticos. Testamos também a possibilidade de uso de outros surfactantes além do SDS.

Uma amostra contendo uma série de álcoois (2-propanol, 1-propanol , 2-butanol, 1-butanol, 3-pentanol, 1-pentanol e 1-hexanol) foi utilizada nos experimentos. A figura 2.5 mostra um conjunto de eletroferogramas relativos ao estudo dos efeitos da concentração de surfactante (SDS), enquanto a figura 2.6 mostra um conjunto de eletroferogramas envolvendo o estudo dos efeitos obtidos com a variação da concentração do tampão. A figura 2.7 traz eletroferogramas onde observamos os efeitos da polaridade de um modificador orgânico utilizado na separação de álcoois.

Para avaliar cada condição calculamos o SNR, LOD, número de pratos (N), e resolução (R) referentes ao 1-pentanol e o 3-pentanol, últimos picos, com exceção do 1-hexanol, não detectado em todas as condições. A tabela 2.2 traz os dados obtidos nesses experimentos.

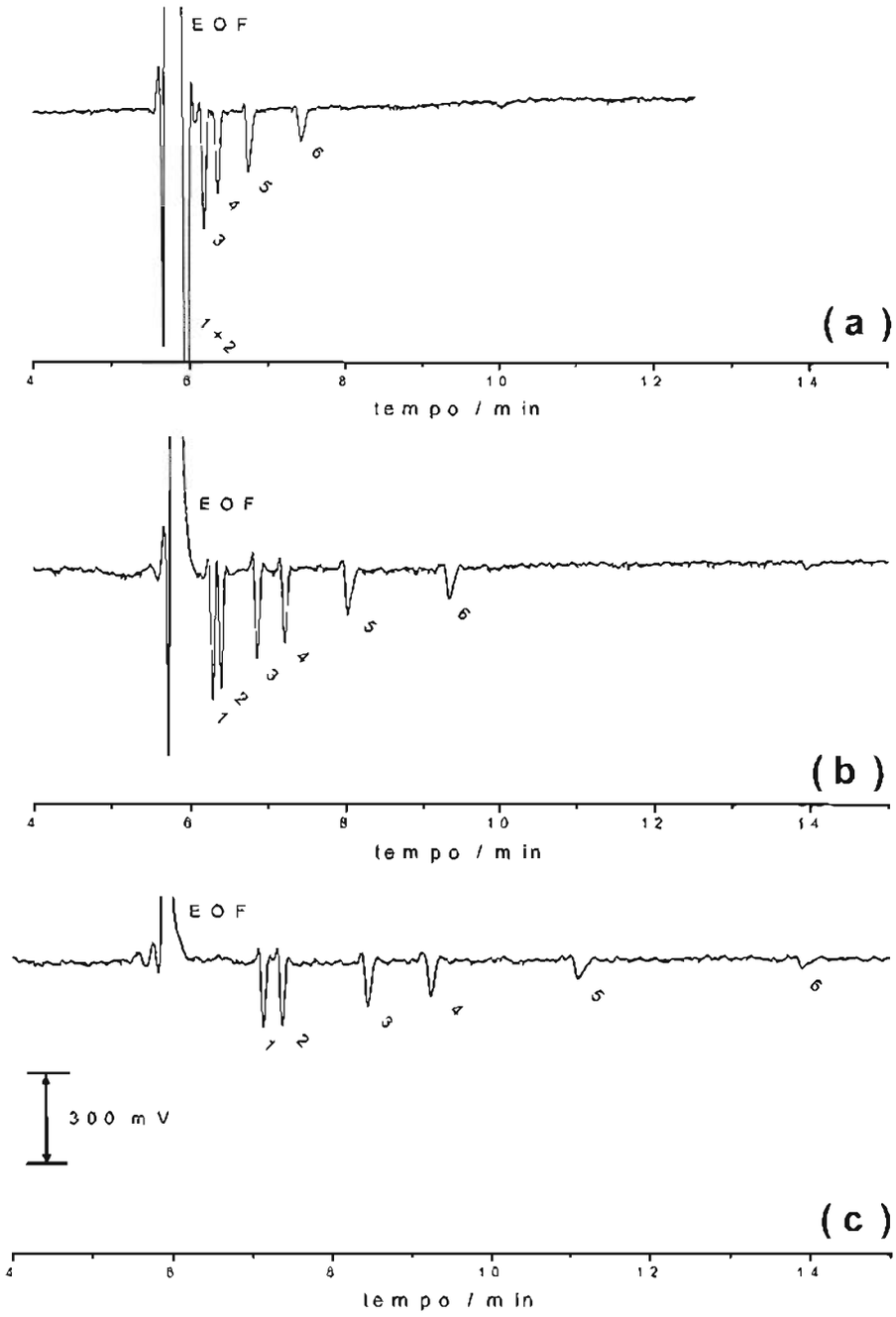


Figura 2.5. Eletroferogramas obtidos com capilar de 60,5 cm (52,5 cm efetivos), potencial aplicado de 15 kV, injeção hidrodinâmica 30 s, 100 mm. Eletrólito tampão fosfato de sódio 25 mmol L^{-1}, pH 6,9, SDS 25 mmol L^{-1} (a), 50 mmol L^{-1} (b) e 100 mmol L^{-1} (c). Picos: 2-propanol (1), 1-propanol (2), 2-butanol (3), 1-butanol (4), 3-pentanol (5), 1-pentanol (6), 2 µL mL^{-1} cada.

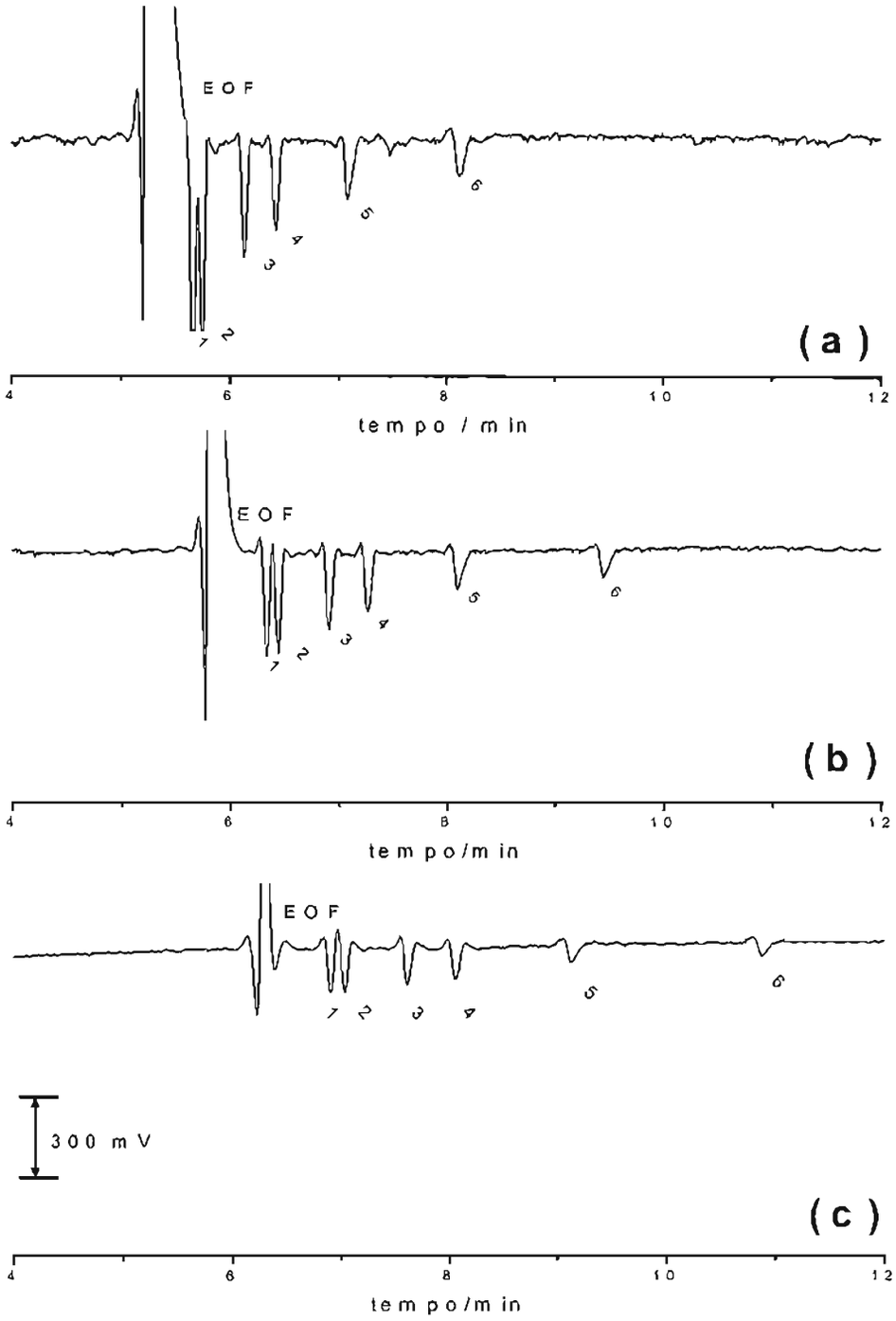


Figura 2.6. Eletroferogramas obtidos com capilar de 60,5 cm (52,5 cm efetivos), potencial aplicado de 15 kV, injeção hidrodinâmica 30 s, 100 mm. Eletrólito SDS 25 mmol L^{-1}, tampão fosfato de sódio pH 6,9, 12,5 mmol L^{-1} (a), 25 mmol L^{-1} (b) e 50 mmol L^{-1} (c). Picos: 2-propanol (1), 1-propanol (2), 2-butanol (3), 1-butanol (4), 3-pentanol (5), 1-pentanol (6), 2 μL mL^{-1} cada..

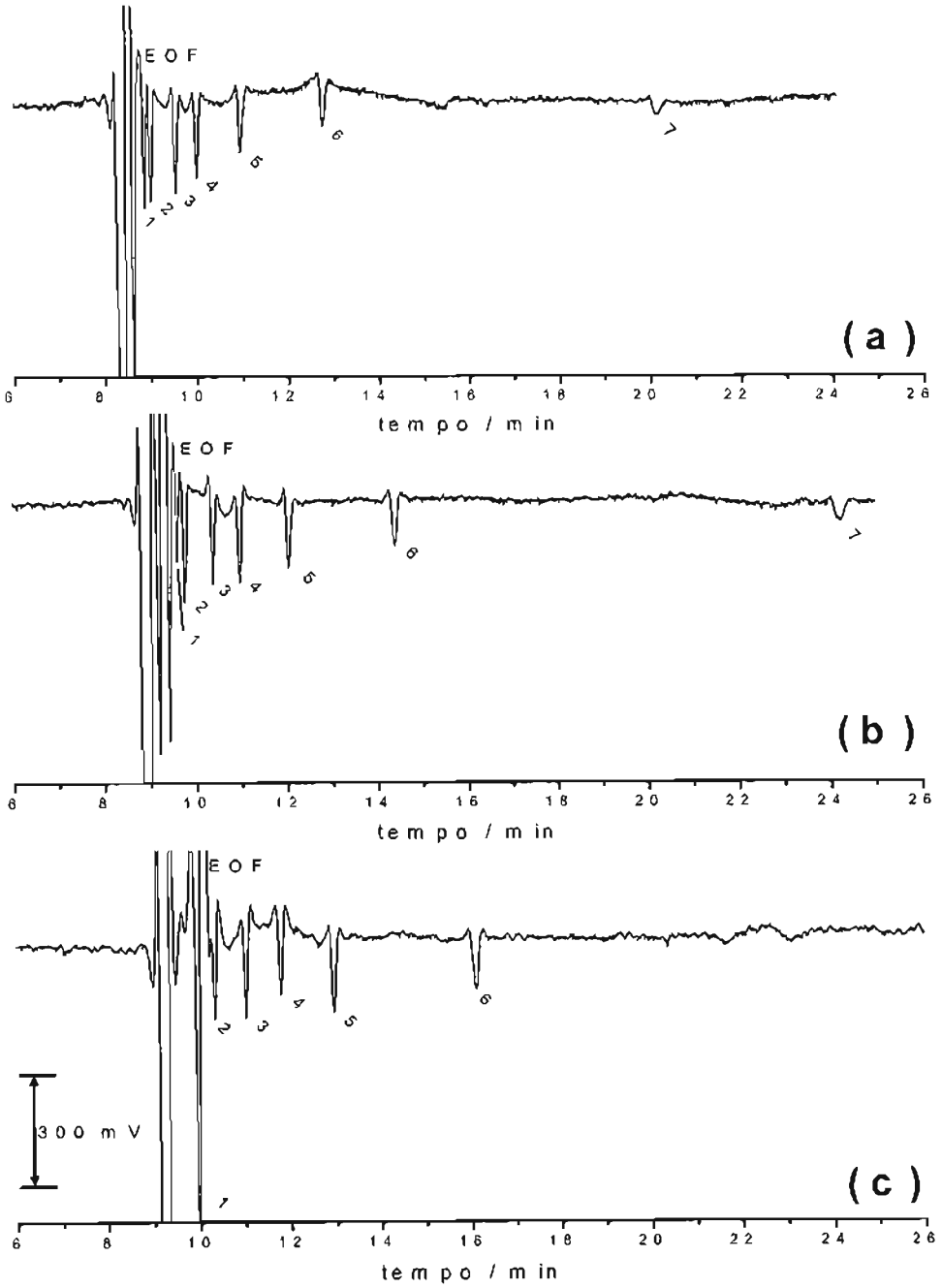


Figura 2.7. Eletroferogramas obtidos com capilar de 60,5 cm (52,5 cm efetivos), potencial aplicado de 15 kV, injeção hidrodinâmica 30 s, 100 mm. Eletrólito tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 6,9, SDS 50 mmol L^{-1}, diluído com 10 % de metanol (a), 10 % de etanol (b) e 10 % de 2-propanol (c). Picos: 2-propanol (1), 1-propanol (2), 2-butanol (3), 1-butanol (4), 3-pentanol (5), 1-pentanol (6), 1-hexanol (7), 2 μL mL^{-1} cada.

Tabela 2.2. Comparação entre os resultados obtidos nas separações de álcools por MEKC.

Eletrólito			Analito	Figura de Mérito			
[S][a]	[T][b]	Mod.[c]		N/10[3]	SNR	LOD[d]	R
25	25	Nenhum	1-pentanol	102	109	510	4,0
			3-pentanol	89	214	260	
50	25	Nenhum	1-pentanol	103	120	460	6,2
			3-pentanol	80	179	310	
100	25	Nenhum	1-pentanol	330	41	1350	12,4
			3-pentanol	85	97	580	
50	12,5	Nenhum	1-pentanol	102	113	490	5,5
			3-pentanol	95	159	350	
50	25	Nenhum	1-pentanol	141	98	570	7,1
			3-pentanol	91	129	430	
50	50	Nenhum	1-pentanol	109	92	610	7,5
			3-pentanol	95	108	520	
50	50	Metanol	1-pentanol	156	125	450	7,7
			3-pentanol	122	168	330	
50	50	Etanol	1-pentanol	173	142	390	9,6
			3-pentanol	144	197	280	
50	50	2-propanol	1-pentanol	151	170	330	11,4
			3-pentanol	154	244	230	

a) Concentração de surfactante (SDS).

b) Concentração de tampão fosfato de sódio pH 6,9.

c) Modificador orgânico com o qual o eletrólito foi diluído em 10 %

d) Dado em $\mu mol\ L^{-1}$, estimado por SNR = 3.

O aumento de concentração do surfactante aumenta a proporção de fase micelar. Com um volume grande fase micelar a solubilização nesse meio é favorecida, o que aumenta o tempo de retenção e a resolução entre os picos. Entretanto, a sensibilidade cai com o aumento da concentração de SDS, o que pode ser explicado por uma redução na quantidade de álcool na fase aquosa, além de um aumento na dispersão.

O aumento da concentração do tampão causa ligeira queda de sensibilidade e aumento da resolução. A presença de sais no meio aquoso provoca um deslocamento dos álcoois para dentro das micelas, conhecido como efeito de *salt-in/salt-out* [23, 25], o que justifica o observado.

A presença do modificador torna o meio muito mais próprio para a solubilização dos álcoois, o que permite a detecção de 1-hexanol e aumenta a sensibilidade na detecção de álcoois por CCD, conforme já observado anteriormente [17]. Possivelmente o deslocamento de uma parcela maior de álcool para o meio aquoso seja o determinante para o aumento de sensibilidade, o que demonstra que a resposta nesse tipo de sistema é complexa e provavelmente envolve a somatória de diferentes fatores, cada um com uma contribuição específica para cada condição.

Com a adição do modificador orgânico ocorre também o aumento do tempo de análise e da resolução entre os picos. Somente a redução da velocidade do fluxo eletroosmótico devido ao aumento de viscosidade não justifica a grandeza do aumento de resolução observado. A ionização das micelas pode explicar esse comportamento. Embora os álcoois de cadeia orgânica curta estejam predominantemente na fase aquosa, uma parte está presente nas micelas, o que aumenta o grau de dissociação das micelas, aumentando suas mobilidades, o que leva a uma janela de eluição maior. Conforme pode se observar o efeito é mais pronunciado com o uso de álcoois mais apolares (efeito 2-propanol > etanol > metanol).

Testamos a possibilidade do uso de CTAB e colato de sódio (SC) para a separação de álcoois por MEKC. Ambos os surfactantes diferem significativamente do SDS. O CTAB é um surfactante catiônico, e embora o SC, a exemplo do SDS, seja um tensoativo aniônico, suas propriedades são muito diferentes. O SC possui um número de agregação e CMC menores que as relativas ao SDS, o que confere uma estrutura totalmente diferente as micelas formadas. No entanto, não obtivemos uma boa separação com micelas de SC, porém sistemas contendo micelas mistas de SDS e SC mostraram-se interessantes. A figura 2.8 mostra uma série de eletroferogramas obtidos nos estudos envolvendo SC.

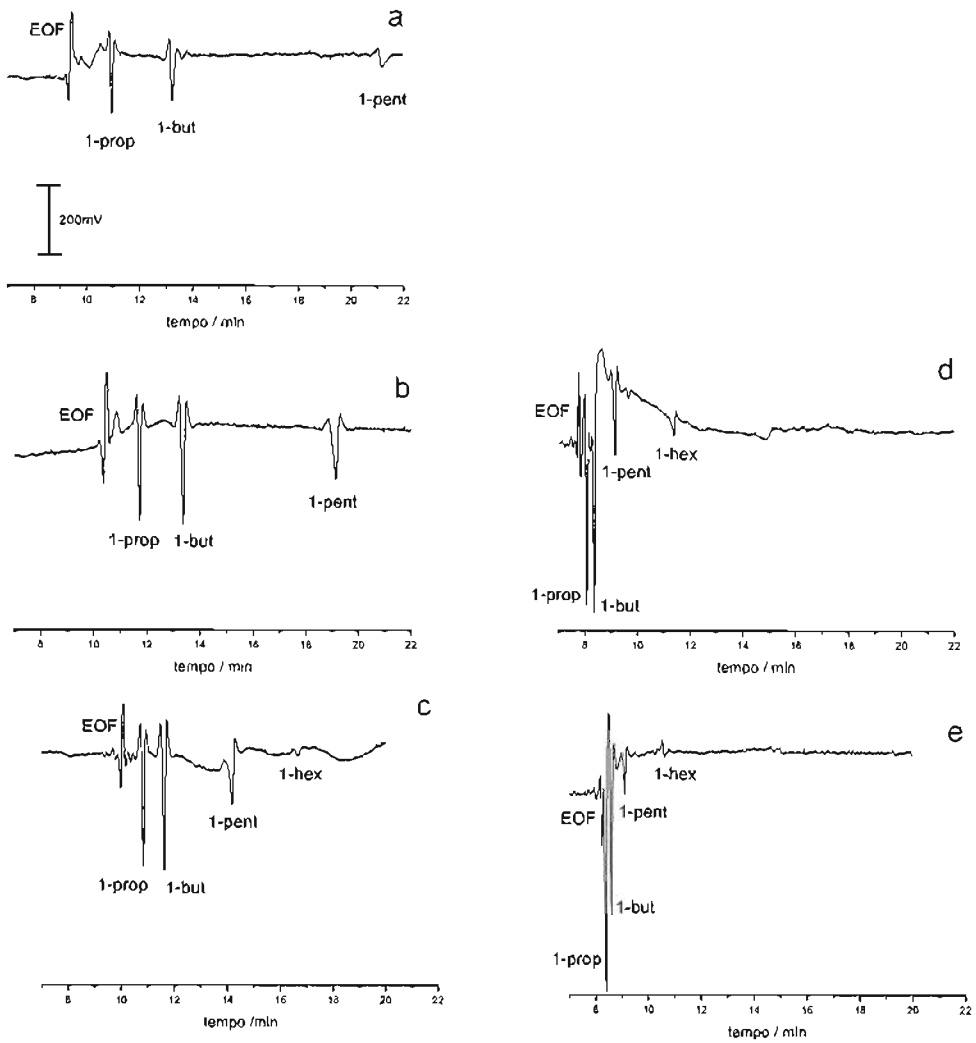


Figura 2.8. Eletroferogramas obtidos com: capilar de 65,5 cm de comprimento (66 cm efetivos), injeção hidrodinâmica, 30 s, 100 mm, potencial aplicado de 15 kV, eletrólito, tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 7,0, SDS 50 mmol L^{-1} (a), SDS 40 mmol L^{-1} e SC 10 mmol L^{-1} (b), SDS 25 mmol L^{-1} e SC 25 mmol L^{-1} (c), SDS 10 mmol L^{-1} e SC 40 mmol L^{-1} (d), SC 50 mmol L^{-1} (e). Picos, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol, todos 5 µl L^{-1}.

Conforme se pode observar, os álcoois são eluídos mais rapidamente em sistemas contendo SC em comparação a sistemas contendo apenas SDS. Partindo-se de uma solução de 50 mmol L^{-1} de SDS para uma solução de 50 mmol L^{-1} de SC, passando por sistemas mistos, verificamos que os tempos de retenção dos álcoois gradativamente são deslocados em direção ao EOF, cujo tempo praticamente permanece inalterado. A

sensibilidade é aumentada com a presença de SC, conforme pode ser observado na tabela 2.3, onde valores de SNR determinados para o 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol servem como comparativo das sensibilidades nesses sistemas. É possível inclusive a detecção de n-hexanol sem a adição de um modificador orgânico.

Embora ocorra aumento de sensibilidade e detecção do 1-hexanol, a exemplo do observado na presença de um modificador orgânico, o efeito é aparentemente contrário quanto à mobilidade das micelas, que é reduzida na presença de SC.

Tabela 2.3. Comparação da SNR para sistemas micelares mistos (SDS e SC).

SDS / CS	Ruído	SNR 1-propanol	SNR 1-butanol	SNR 1-pentanol
50/0	$4{,}98 \times 10^{-4}$	444	331	96
40/10	$5{,}37 \times 10^{-4}$	642	665	331
25/25	$5{,}09 \times 10^{-4}$	777	838	326
10/40	$5{,}56 \times 10^{-4}$	977	1075	451
0/50	$5{,}12 \times 10^{-4}$	1380	1053	252

Testamos a possibilidade de separação dos álcoois utilizando micelas catiônicas, formadas por CTAB. Nesse sistema, não obtivemos uma linha base muito estável, porém a separação das espécies foi bem satisfatória. Com esse sistema verificamos a possibilidade do uso de capilares de diâmetros menores, uma vez que normalmente os eletrólitos empregados em MEKC são bastante condutivos. Apesar da perda de sensibilidade, separações mais rápidas podem ser realizadas em capilares de 20 μm de d.i., conforme pode ser observado na figura 2.9.

Com o CTAB como surfactante é possível a detecção de 1-hexanol sem a presença de modificador orgânico.

Na figura 2.9.b não é observado um fenômeno de *overshooting*, presente em todas as outras condições. Esse fenômeno, onde as regiões imediatamente adjacentes aos picos apresentam uma resposta contrária de condutividade, não é observado apenas em MEKC e, apesar de ainda não bem compreendido, demonstra ser dependente tanto da constituição e concentração do eletrólito, como da geometria da cela.

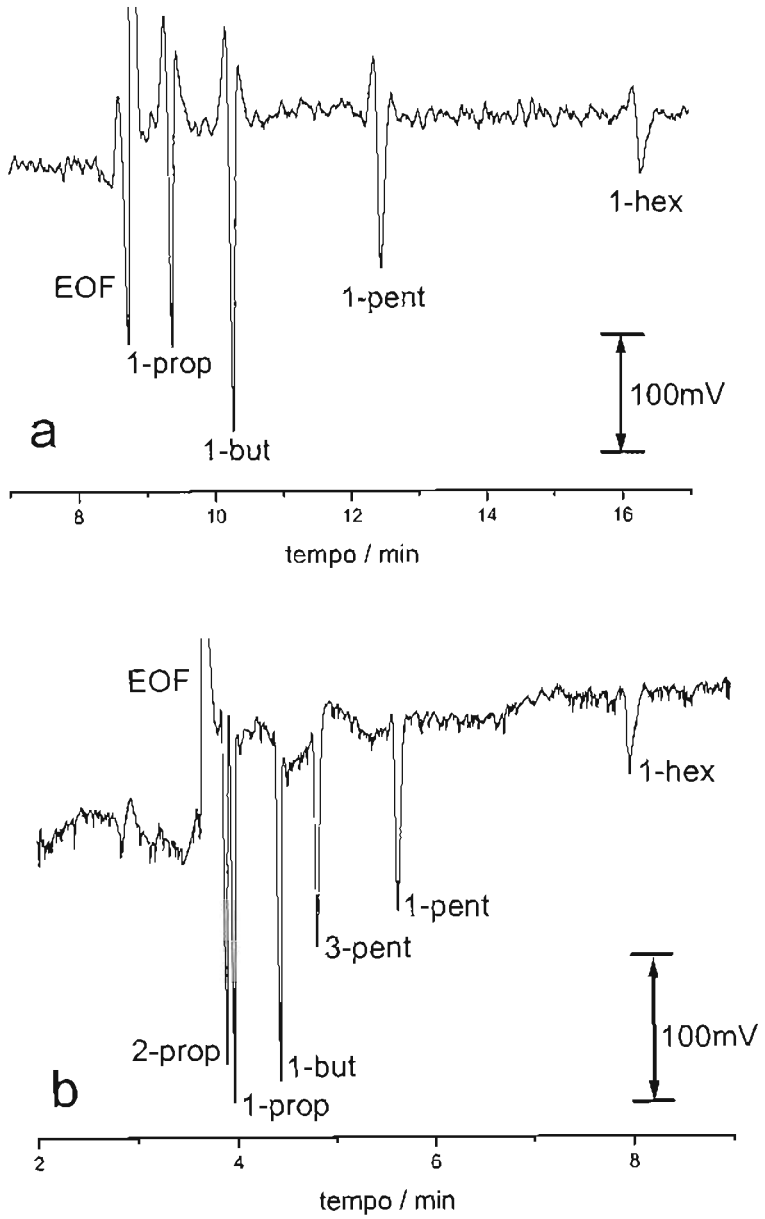


Figura 2.9.. Eletroferogramas obtidos com eletrólito tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 7, CTAB 50 mmol L^{-1}, potencial aplicado 15 kV, injeção hidrodinâmica 30 s, 100 mm. Demais condições: (a) capilar de 50 μm de d.i., comprimento total 65,5 cm (57 cm efetivos), concentração dos álcoois, todos 5 μl ml^{-1}; (b) capilar de 20 μm de d.i., comprimento total 44 cm (35,5 cm efetivos) concentração dos álcoois, todos 10 μl ml^{-1}

Como é comum em técnicas de separação, a melhor composição do eletrólito é dependente da constituição da amostra, mesmo quando tratamos de analitos semelhantes, como uma mistura de álcoois ou mesmo uma série de isômeros (como a série de pentanóis apresentada), e existe um compromisso entre sensibilidade, resolução e freqüência analítica, que deve ser otimizado para cada caso específico. Portanto, não podemos indicar uma das condições testadas como a melhor condição para separação de álcoois.

2.4. Proposição do mecanismo de detecção em MEKC

O objetivo desta seção é propor um mecanismo que explique a origem dos picos negativos observados com detecção por CCD em MEKC. Para melhor compreender o ponto em questão, é interessante uma breve explicação sobre alguns trabalhos realizados previamente com outros modos de detecção e como, à primeira vista, isto se contrapõe ao que foi observado no presente trabalho. Uma vez proposto, nosso objetivo será demonstrar a compatibilidade do mecanismo com os resultados prévios obtido por outros autores.

Diversos trabalhos foram publicados com propostas de detecção indireta por UV ou fluorescência em MEKC, nos quais analitos sem grupos cromóforos ou fluoróforos puderam ser detectados. Os primeiros resultados com detecção CCD de álcoois alifáticos em MEKC também apresentaram picos negativos, o que, num primeiro momento, parecia ser razoável, já que se acreditava que os álcoois provocassem uma redução local da condutividade por mudanças na solvatação dos diversos íons. No entanto, os resultados do presente trabalho demonstraram que alguns álcoois provocam um aumento da condutividade, o que deveria resultar em picos positivos. Assim, um mecanismo mais complexo deve ocorrer durante a separação por MEKC, e para se entendê-lo é necessário um conhecimento mais detalhado de alguns fenômenos que ocorrem quando compostos, como os álcoois, são adicionados a sistemas micelares.

Considerando o SDS, abaixo da CMC, os íons DS^- encontram-se predominantemente dissociados dos Na^+, e nenhum comportamento diferenciado de outros eletrólitos merece ser destacado. Já acima da CMC, ocorre a formação das micelas que são estruturas maiores e, no caso, com cargas negativas. Obviamente, este

novo ânion deve apresentar mobilidade diferenciada daquela do monômero DS^- livre. Além do mais, devido à alta densidade de carga, a total dissociação dos cátions não ocorre. Estudos têm demonstrado que um grande número de íons Na^+ se agregam à micela, resultando numa estrutura com carga efetiva bem menor, em módulo, que aquela correspondente à simples soma das cargas dos monômeros que a compõem. A figura 2.10 ilustra a dissociação e a ionização das micelas.

A adição de um composto não iônico perturba significativamente a estrutura micelar, com conseqüentes alterações nas mobilidades e, portanto, condutividade do meio. Zana [23] reuniu os resultados de diversos trabalhos sobre sistemas surfactante-álcool, permitindo que algumas propriedades importantes fossem sumarizadas.

Considerando o equilíbrio

$$nS^- + mG^+ = M_n^{m-n} \qquad \text{Eq. 2.1}$$

onde S^-, G^+ e M_n^{m-n} são o surfactante aniônico, o contra-íon catiônico e a micela com número de agregação n; a constante de micelização é dada por

$$K_c = [M_n]/([S]^n\,[G]^m) \qquad \text{Eq. 2.2}$$

Esta constante aumenta com a força iônica e com o número de carbonos da cadeia do álcool. Por outro lado, diminui com a concentração do álcool. Desta forma, um álcool tem a capacidade de disponibilizar uma maior quantidade de espécies monoméricas.

A CMC diminui com a concentração de álcoois de cadeia longa, aumenta com a concentração de álcoois de cadeia curta e apresenta comportamento intermediário para álcoois de cadeia também intermediária. A alteração da CMC pela adição de álcoois é, portanto, um fator que aumenta a complexidade do sistema, já que novas espécies – com diferentes mobilidades – devem ser formadas.

O grau de dissociação aumenta com a concentração de um álcool. Isto se deve basicamente ao aumento do volume da micela e conseqüente diminuição da densidade de carga do ânion. Desta forma, um álcool teria a capacidade de aumentar em módulo a mobilidade efetiva tanto das espécies monoméricas como da micela.

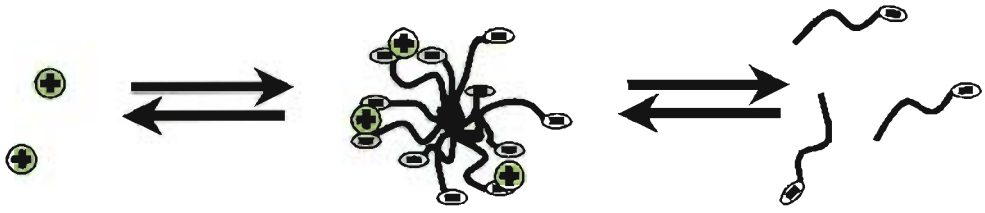


Figura 2.10. Representação da dissociação (liberação do contra-íon) e ionização (equilíbrio entre monômeros e micelas) de um sistema micelar contendo um surfactante aniônico (como o SDS). A presença de álcoois afeta os dois equilíbrios aqui representados.

Além destes fenômenos, deve-se considerar o efeito do álcool como uma espécie que altera a viscosidade do meio aquoso e a camada de solvatação dos demais íons presentes no tampão. Embora cada caso deva ser considerado em separado, a tendência geral é a diminuição da mobilidade das espécies iônicas, como observado nos experimentos realizados, no presente trabalho, na ausência de SDS.

Este complexo conjunto de fenômenos permite observar que os álcoois apresentam influências ambíguas sobre a condutividade do eletrólito utilizado em MEKC. Os resultados globais sobre os eletrólitos utilizados neste trabalho foram apresentados, e se observa que, em alguns casos, há o aumento de condutividade e em outros, há uma diminuição.

Até este ponto, foram considerados os fenômenos que levam ao comportamento do eletrólito em condições não eletroforéticas, o que ainda não permite um direto entendimento do processo de detecção.

O que postulamos para explicar esse processo é a predominância de dois dos fenômenos citados: (i) o efeito sobre a constante de micelização e (ii) o efeito sobre o grau de dissociação. Durante a migração da banda contendo um álcool, prevaleceriam os efeitos de dissociação das micelas e de ionização das mesmas. Assim, localmente, seriam geradas espécies de alta mobilidade que se deslocariam com velocidades, em módulo, maiores. O resultado seria uma diminuição local do conteúdo iônico devido à diminuição das concentrações das espécies envolvidas na formação das micelas. À medida que estas espécies se afastassem da região contendo o analito, o equilíbrio seria restabelecido, retornando-se a uma condição de uniformidade da composição e, portanto, da linha base do detector.

Este processo de propagação de uma região de baixa concentração é conhecido em CE como vacância, e o resultado seria registrado através do detector como um sinal de condutividade que momentaneamente é diminuída, originando os picos negativos.

O primeiro teste para esta teoria é responder à seguinte questão: Se há uma depleção local de íons, para onde estes estariam se deslocando? Esta pergunta é pertinente, pois deveria ser possível observar uma região rica em íons e com uma conseqüente elevação da condutividade. De fato, a região correspondente ao *plug* de injeção da amostra – comumente conhecida como pico referente ao EOF – possui uma série de irregularidades, alternando regiões de baixa e alta condutividade em relação à linha base. Postulamos que as perturbações causadas pelos analitos reflitam-se nesta região, já que a aparente instabilidade – isto é, o número de perturbações em relação à linha base – é dependente do número de álcoois presentes na amostra.

Não fomos capazes de realizar experimentos que comprovassem definitivamente esta teoria, mas optamos por reunir alguns trabalhos da literatura cujos resultados corroborem a proposta.

A detecção indireta por fluorescência em MEKC foi proposta por Amankwa e Kuhr [26] e utilizada por diversos outros autores [27, 28, 29]. O mecanismo proposto para justificar o aparecimento dos picos negativos baseia-se em dois fenômenos: (i) uma espécie fluorófora deve apresentar maior rendimento quântico de fluorescência na fase micelar e (ii) o analito deve deslocar este fluoróforo da micela. De fato, vários autores têm observado o aumento do rendimento quântico na fase micelar, o que é atribuído à proteção do estado excitado do fluoróforo pela micela [28]. Já a competição pelos sítios de adsorção na micela ou mudança da constante de partição do fluoróforo devido à presença do analito não é inequivocamente demonstrada. Isso se deve em parte pela total desconsideração dos autores quanto aos efeitos dos analitos sobre a dissociação e ionização das micelas.

Apesar disso, o mecanismo que tem sido proposto não é, de toda forma, inválido já que há uma boa concordância com alguns resultados experimentais. No entanto, o mecanismo que estamos propondo permitiria também explicar os picos negativos com a detecção por fluorescência indireta, já que a vacância de micelas e fluoróforos na região do analito gerariam o mesmo efeito na forma de pico negativo. Além do mais, o aumento da concentração de espécies fluoróforas na região do pico correspondente ao EOF, conforme previsto por nosso modelo, é observável em alguns dos trabalhos na forma de picos positivos de fluorescência [28].

Com essas considerações, acreditamos ter demonstrado que os resultados por nós obtidos e por outros autores não desqualificam o mecanismo proposto, o qual deve servir para aumentar o entendimento do processo de separação e detecção em MEKC. Obviamente, como demonstrado, o conjunto de fenômenos é bastante complexo e merecedor de futuros e complementares estudos que fogem ao escopo do presente trabalho.

Capítulo 3

Determinação de carboidratos

3.1 Introdução

Carboidratos são espécies de extrema importância para a vida e representam, dessa forma, uma classe de grande interesse para diversas áreas de pesquisa, como a bioquímica e a tecnologia e engenharia de alimentos. Diante desse fato, essa classe de compostos está constantemente no foco de técnicas analíticas, dentre as quais a CE, que nos últimos anos vem demonstrando-se uma ótima ferramenta para os estudos relacionados a carboidratos.

Devido aos seus princípios básicos, a eletroforese é uma técnica aplicável principalmente para a separação de espécies iônicas, uma característica que não é a mais marcante para o caso dos carboidratos. Dessa forma, a separação dessa classe de substâncias é baseada em modificações químicas, que podem ser permanentes [30 - 34] ou dinâmicas [30, 35 - 39], resultando em espécies portadoras de carga.

A complexação de carboidratos com borato e com cátions de metais são exemplos de modificações dinâmicas, consideradas por diversos autores como separações de carboidratos não-derivatizados, dentro das quais podemos classificar a separação de carboidratos em pHs altos o suficiente para promover a dissociação dos mesmos. Apesar de ter sido demonstrado que a complexação com borato promove um aumento de duas a cinqüenta vezes na absortividade molar a 195 nm [40] de mono e oligossacarídeos, essas estratégias visam basicamente a promoção de carga aos analitos.

As modificações permanentes, ou derivatizações, permitem não apenas tornar os carboidratos espécies iônicas como espécies absortivas ou fluorescentes. Essa abordagem é particularmente atrativa porque os carboidratos não possuem boa absortividade ou fluorescência, propriedades nas quais se baseiam os modos mais utilizados de detecção em CE.

Apesar das estratégias de derivatização estarem bem estabelecidas e proporcionarem por muitas vezes excelentes resultados com relação à sensibilidade, trata-se de um passo adicional na análise, de forma a abrir espaço para a proposição e desenvolvimento de técnicas de detecção não dependentes de derivatizações para a análise de carboidratos.

Existem diversos métodos no que diz respeito a detecção, baseados em espectrometria de massas, amperometria e índice de refração [36, 41, 42]. Outra abordagem comum é o uso detecção UV indireta [39, 43, 44].

Neste trabalho apresentamos um método para a determinação de carboidratos, especificamente mono e dissacarídeos, por CE com CCD. Decorrente da baixa mobilidade eletroforética dos açúcares dissociados, o registro dessas espécies é observado como picos negativos. Podemos então classificar essa abordagem como detecção condutométrica indireta de espécies não derivatizadas. Para ilustrar as possibilidades do método foram feitas algumas determinações de açúcares em algumas amostras de bebidas.

3.2 Material e métodos

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As soluções foram preparadas através da dissolução direta desses reagentes ou através da diluição de soluções estoque. Em ambos os casos foi utilizada água deionizada, com resistividade elétrica maior ou igual a 18 MΩ (Nanopure UV, Barnsted).

As amostras utilizadas para determinação de carboidratos foram obtidas diretamente em supermercados e a preparação se limitou a degaseficação em banho de ultra-som a temperatura ambiente, para o refrigerante de cola, seguida de diluição em água deionizada. As amostras foram filtradas em membrana de porosidade 0,45 μm em PVDF (Millex, Millipore).

Os pHs dos eletrólitos de corrida não foram diretamente medidos devido ao grande erro relativo a medidas realizadas na faixa de pH utilizada. Para controlar as condições experimentais utilizou-se uma solução padronizada (por titulação) de NaOH 0,5 $mol.L^{-1}$ para o preparo dos eletrólitos de corrida.

Os eletroferogramas apresentados neste capítulo foram obtidos através de três capilares (J&W Scientific) de sílica fundida. Capilar 1: 375 μm de d.e. e 50 μm de d.i., com 68,5 cm de comprimento (60 cm do ponto de injeção ao detector); capilar 2: 375 μm de d.e. e 20 μm de d.i, com 44 cm de comprimento (35,5 cm do ponto de injeção ao detector); capilar 3: 375 μm de d.e. e 50 μm de d.i, com 65 cm de comprimento (56,5 cm do ponto de injeção ao detector).

Os potenciais aplicados foram 11 kV (capilar 1), 25 kV (capilar 2) e 15 kV (capilar3). A introdução das amostras foi sempre realizada de forma hidrodinâmica pela elevação do reservatório do cátodo.

O condicionamento dos capilares, assim como o equipamento de CE, encontram-se descritos na seção de materiais e métodos do capítulo 2.

3.3 Resultados e discussão

O eletrólito de corrida pode atuar somente como um meio físico para uma dada separação determinada apenas pelas diferenças de mobilidades entre as espécies em análise. Porém, na prática, o eletrólito é responsável direto para a obtenção de seletividade nas separações, do controle do pH através de sistemas tampão, e até separações quirais envolvendo aditivos opticamente ativos.

É um fato bem conhecido que a melhor composição do eletrólito de corrida depende não só da aplicação (matrix e analitos) assim como do sistema de detecção empregado. De fato, a separação de carboidratos por CE já vem a muito sendo estudada, e neste trabalho apresentamos os estudos da detecção dessas espécies por CCD.

Em CCD o eletrólito deve ser escolhido não apenas para possibilitar a separação das espécies, mas deve conter um co-íon com mobilidade significativamente diferente da mobilidade dos analitos. Essa diferença é responsável direta pela sensibilidade obtida, pois modula a amplitude da variação na condutividade da zona do analito. Por exemplo, se a amostra contêm como analitos cátions de baixa mobilidade, é preferido o uso de um eletrólito contendo cátions de alta mobilidade, mesmo com uma contribuição negativa, aumentando o aquecimento do capilar. É necessário alcançar um equilíbrio de forma a otimizar a SNR. Uma discussão mais aprofundada pode ser encontrada na seção 1.6, que trata justamente da CCD.

Levando em consideração essas observações, a escolha por um eletrólito de alto pH é justificada. Os açúcares dissociados representam espécies de baixa mobilidade e o íon hidroxila (o ânion majoritário do eletrólito) é exatamente o ânion de maior mobilidade em meio aquoso.

É um fato bem conhecido que a concentração de NaOH afeta o tempo de análise e a resolução na determinação de carboidratos [36, 39, 43, 44]. A figura 3.1 é composta por eletroferogramas obtidos utilizando-se diferentes concentrações de base. Duas características devem ser notadas: a sensibilidade e um fenômeno de *overshooting*. Reduzindo-se a concentração de NaOH a linha base torna-se mais estável e a intensidade dos picos aumenta significativamente. A estabilização da linha base está relacionada à redução da condutividade do eletrólito.

O aumento da intensidade dos picos não tem uma explicação tão óbvia. Entretanto o efeito é pronunciado, inclusive o eletroferograma 3.1c foi obtido injetando-se o dobro do volume de amostra em relação aos eletroferogramas 3.1a e 3.1b. A hipótese é a de que, reduzindo o pH, ocorre a redução das mobilidades efetivas dos açúcares, de forma a aumentar as diferenças de mobilidade entre os analitos e os co-íons do eletrólito. Outra vantagem de se trabalhar em menores concentrações é a redução do *overshooting*, tornando os picos melhor delimitados, o que permite uma maior precisão na determinação das áreas dos picos.

O fenômeno de *overshooting* ainda não é bem compreendido, e ocorre dependendo das condições experimentais, tais como a geometria da cela e a composição do eletrólito. Este comportamento já havia sido observado na separação de álcoois alifáticos por MEKC utilizando a CCD [17], e parece ser característico desse tipo de detecção, uma vez que em condições similares, mas empregando-se detecção amperométrica ou espectrofotométrica, não é observado o fenômeno [36, 39, 43, 44].

O par crítico galactose-lactose sofre uma alteração na ordem de migração quando a elevação do pH promove um aumento mais pronunciado na velocidade de migração da galactose em relação à lactose.

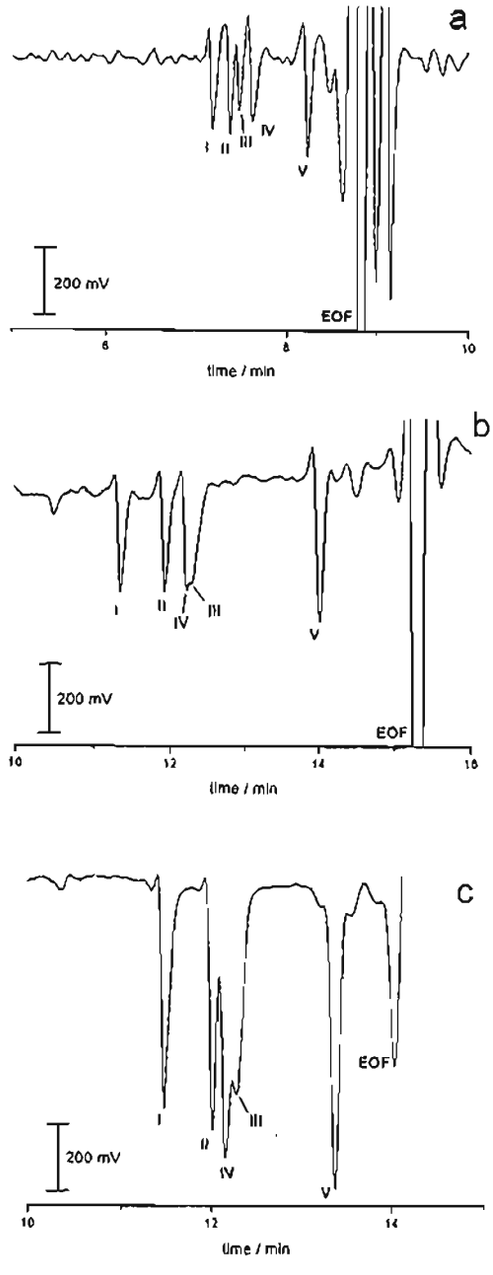


Figura 3.1. Efeitos da concentração de NaOH na separação e resposta do detector. As figuras (a), (b) e (c) mostram eletroferogramas obtidos com eletrólitos contendo NaOH 50 mmol L^{-1}, 25 mmol L^{-1} e 10 mmol L^{-1}, respectivamente. Todos os eletrólitos continham 0,2 mmol L^{-1} de CTAB para reverter o EOF. A amostra continha 1 mmol L^{-1} de frutose (I), glicose (II), galactose (III), lactose (IV) e sacarose (V). Capilar 1, injeção 100 mm por 30 s (a) e 100 mm por 15 s (b) e (c).

Numa etapa posterior, foram avaliados possíveis aditivos para aumentar a eficiência e sensibilidade da determinação. Caminhamos na tentativa de reduzir a condutividade do eletrólito de corrida. Para tal, testamos o uso de um modificador orgânico, no caso o metanol, e o uso de um eletrólito tamponado com fosfato de sódio.

A figura 3.2 mostra eletroferogramas de uma mistura de sacarídeos separados com o uso de eletrólitos contendo 30 mmol L^{-1} de NaOH, 30 mmol L^{-1} de NaOH mais 12 % (v/v) de metanol e 30 mmol L^{-1} de NaOH mais 15 mmol L^{-1} de Na_2HPO_4. Em todos os casos picos negativos foram obtidos. Alguns parâmetros foram usados para efeito de comparação: a resolução do par crítico galactose-lactose, o tempo de migração e a estabilidade da linha base, incluindo o fenômeno de *overshooting*.

A adição de metanol tinha a pretensão de diminuir a condutividade do eletrólito, aumentando dessa forma a SNR. Apesar da redução da condutividade, constatada pela redução da corrente de 24 μA para 18 μA, não houve uma estabilização significativa da linha base. Por outro lado, devido a redução do EOF, observamos uma melhora na resolução do par crítico.

A adição de fosfato resultou em uma melhora considerável na linha base e na resolução. Porém, a sensibilidade foi reduzida e o tempo de análise foi consideravelmente aumentado. A estabilização da linha base pode ser atribuída ao efeito tampão, que impede grandes oscilações da condutividade do meio, principalmente pelo fato da hidroxila ser o ânion majoritário no sistema. Já a redução da sensibilidade pode ser compreendida levando em consideração que nesse caso o eletrólito possui três ânions: OH^-, HPO_4^{2-}, e PO_4^{3-}. Os íons fosfato não apresentam a mesma magnitude de mobilidade que a hidroxila, no entanto, para manter a neutralidade elétrica da região do plug de amostra, duas moléculas de açúcar dissociadas são necessárias para substituir uma HPO_4^{2-}, e três para substituir uma PO_4^{3-}.

Através desses estudos observa-se que a resolução do par crítico galactose-lactose é obtida através do aumento da concentração de base, porém causando um prejuízo à sensibilidade e mesmo à quantificação, visto que o *overshooting* é mais pronunciado nessa situação (figura 3.2c). Dessa forma, para amostras mais simples, trabalhar em concentrações menores de NaOH é interessante, pois nessa situação temos uma sensibilidade maior. Para espécies de menor mobilidade, como a sacarose dissociada, a presença de fosfato é interessante por aumentar a resolução entre o pico do analito e a perturbação causada pelo EOF.

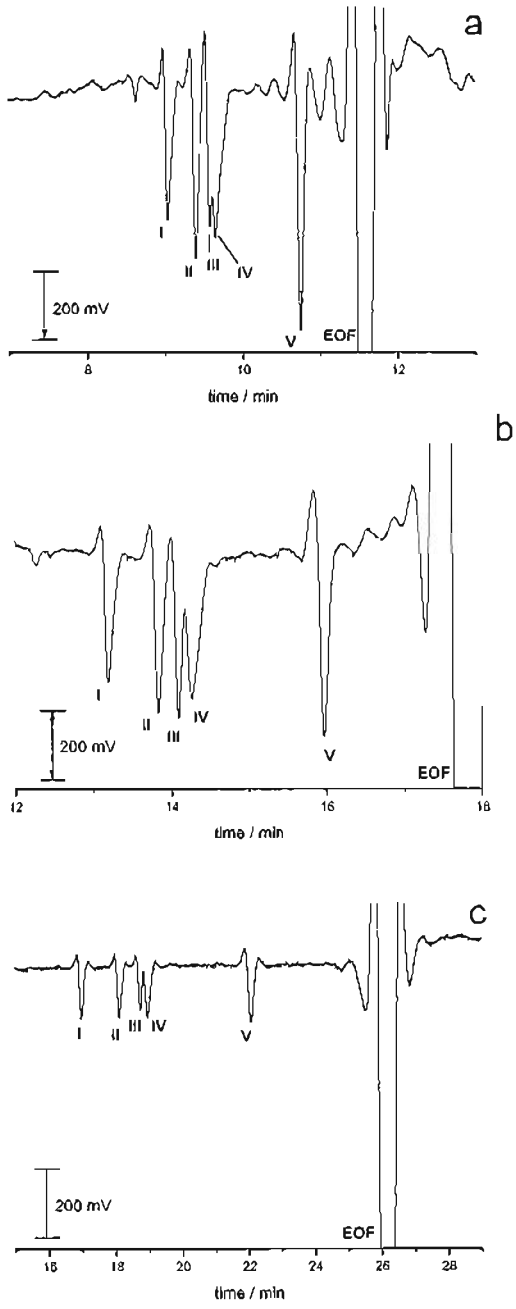


Figura 3.2. Efeitos do metanol e fosfato na separação e resposta do detector. As figuras (a), (b) e (c) mostram eletroferogramas obtidos com eletrólitos contendo 30 mmol.L^{-1} de NaOH, 30 mmol.L^{-1} de NaOH mais 12% de metanol e 30 mmol.L^{-1} de NaOH mais 15 mmol.L^{-1} de Na_2PO_4, respectivamente. Todos os eletrólitos continham 0,2 mmol.L^{-1} de CTAB para reverter o EOF. A amostra continha 1 mM de frutose (I), glicose (II), galactose (III), lactose (IV) e sacarose (V). Capilar 1, injeção 100 mm por 30 s.

Melhores resultados foram obtidos com o uso de um capilar com diâmetro interno de 20 μm de d.i., o que permitiu a aplicação de um campo elétrico mais elevado, reduzindo tempo de análise e aumentando a eficiência para os açúcares. A figura 3.3 mostra eletroferogramas de amostras reais usando um capilar de 20 μm de diâmetro interno. O eletrólito (NaOH 10 mmol L^{-1}, Na_2HPO_4 4,5 mmol L^{-1} e CTAB 0,2 mmol L^{-1}) foi otimizado para dar uma sensibilidade adequada, pequeno tempo de análise e resolução suficiente para a separação de açúcares em diversos tipos bebidas. Como as bebidas escolhidas não apresentavam galactose em sua composição, esse açúcar foi escolhido como padrão interno para todos os casos. Nessas condições o *overshooting* praticamente não é observado.

A seqüência experimental obedece a ordem apresentada na figura, indo de 3.3a a 3.3f. Depois da amostra d observamos um aumento no tempo de migração, provavelmente devido à redução do EOF por fenômenos de adsorção.

A tabela 3.1 apresenta os parâmetros da curva analítica preparada com cinco padrões de 1 a 5 mmol L^{-1} de frutose, glicose e sacarose, todas contendo 3 mmol L^{-1} de galactose como padrão interno. Os resultados demonstram que não há evidências de erros sistemáticos. As sensibilidades inferidas através da inclinação não são significativamente diferentes para os mono-sacarídeos, enquanto a sensibilidade para a sacarose é maior.

Tabela 3.1. Parâmetros da curva analítica[a]

Açúcar	A	B / mM^{-1}	R^b
Frutose	-0.028 ± 0.028	0.3433 ± 0.0085	0.9975
Glicose	-0.070 ± 0.032	0.3436 ± 0.0096	0.9969
Sacarose	0.004 ± 0.022	0.3970 ± 0.0065	0.9989

[a] $Y = A + B \cdot C$, onde Y é a área relativa à área do padrão interno (galactose 3.0 mmol.L^{-1}) e C é a concentração em mmol L^{-1};

[b] Coeficiente de correlação para 10 dados.

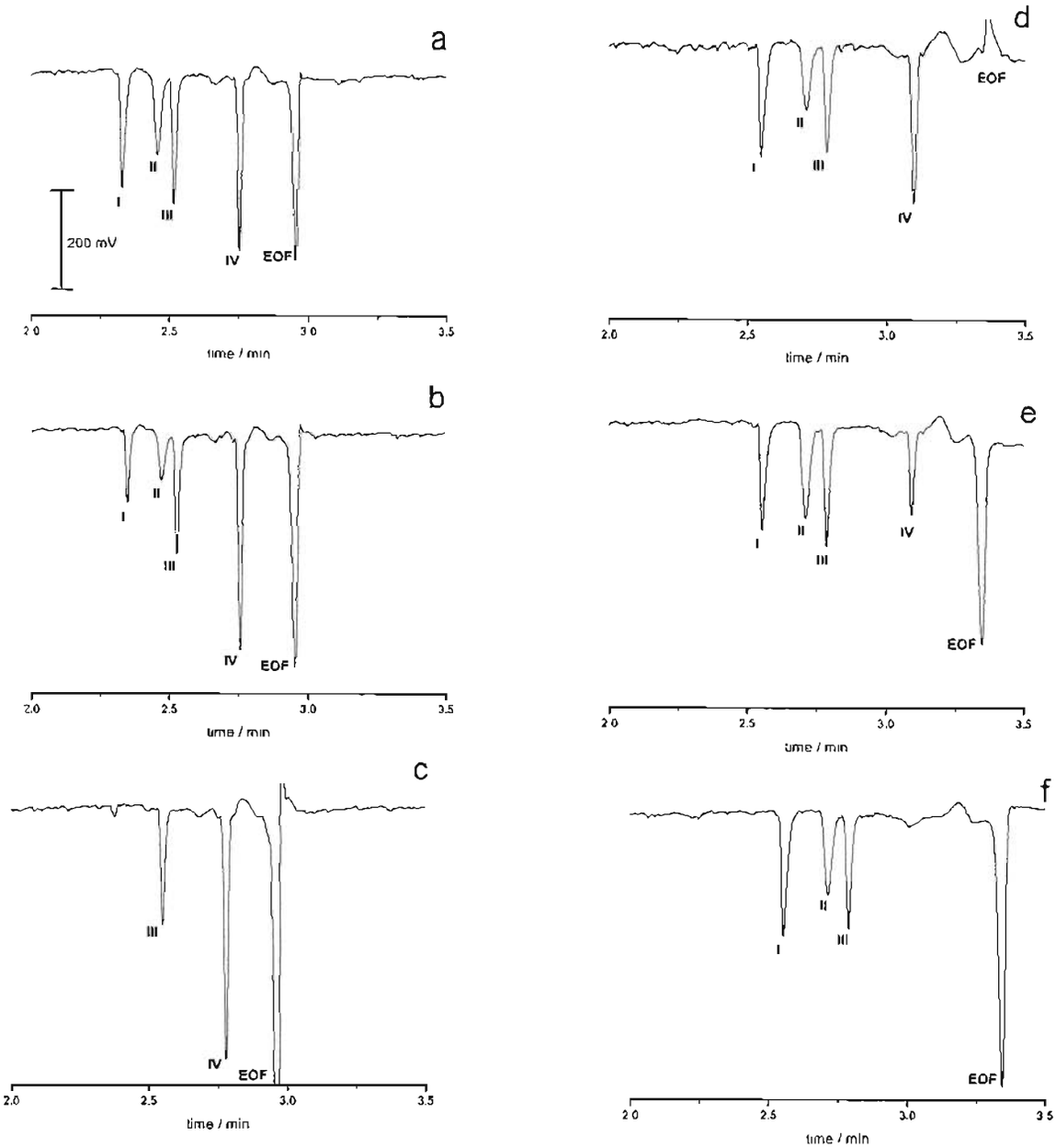


Figura 3.3. Eletroferogramas de (a) solução padrão de 3 mmol L^{-1} de frutose, glicose, galactose e sacarose; (b) refrigerante a base de cola (diluição 2:100); (c) aguardente de cana de açúcar (diluição 1:10); (d) suco de laranja *in natura* (diluição 3:100); (e) bebida isotônica (diluição 3:100); (f) suco concentrado de uva (diluição 1:100). Eletrólito de corrida NaOH 10 mmol L^{-1}, Na_2HPO_4 4,5 mmol L^{-1} e CTAB 0,2 mmol L^{-1}. Picos: frutose (I), glicose (II), galactose (III) e sacarose (IV). Foi utilizado o capilar 2, com injeção hidrodinâmica: 100 mm por 20 s.

A tabela 3.2 mostra a concentração de açúcares nas diferentes amostras analisadas, assim como a quantidade total de carboidratos informada pelo fabricante, quando disponível. Os resultados obtidos demonstraram-se concordantes.

Tabela 3.2. Resultados da análise de açúcares em bebidas[a]

	Refrigerante	Isotônico	Suco de Laranja	Suco de Uva	Aguardente
Frutose	16,3	17,5	20,4	64,9	nd[b]
Glicose	16,5	21,8	16,8	57,7	nd
Sacarose	73,7	18,2	36,0	nd	17,4
Total	106	57,5	73,2	123	17,4
Valores de rótulo[c]	105	60	-	130	-

[a] Todos os valores em g L^{-1};

[b] nd – não detectado;

[c] Os valores de rótulo referem-se a quantidade total de carboidratos.

A faixa linear para a frutose foi avaliada utilizando sacarose 3 mmol L^{-1} como padrão interno. Baseado em 20 eletroferogramas de soluções contendo de 125 µmol L^{-1} a 64 mmol L^{-1}, um coeficiente de correlação de 0,9995 foi obtido. A solução mais concentrada (64 mmol L^{-1}) foi analisada reduzindo o tempo de injeção de 20 s para 10 s, devido a saturação do detector com pico de sacarose nessa condição. Uma regressão linear graficada em escala logarítmica foi aplicada para avaliação do limite de linearidade. Nesse caso a inclinação (1,013 $\pm$0,014) não é significativamente diferente de um, o que sugere que o limite de linearidade é ainda maior que 64 mmol.L^{-1}. No entanto para concentrações acima desse valor seriam necessários não só a redução do tempo de injeção, como o aumento da concentração do padrão interno.

A tabela 3.3 apresenta o número de pratos e o limite de detecção para frutose, glicose, galactose e sacarose. Apenas a glicose difere significativamente do grupo. O número de pratos é comparável com os de outros trabalhos [36, 39]. O limite de detecção é comparável com o obtido através de detecção indireta por UV [39, 43, 44].

Tabela 3.3. Número de pratos[a] e limite de detecção[b]

	Frutose	Glicose	Galactose	Sacaose
Número de pratos	168.200	70.700	130.400	164.900
LOD / μ mol.L^{-1}	16	31	18	13

[a] Estimado por $N = 5.54 \cdot (t_m/w_{1/2})^2$, onde t_m é o tempo de migração e $w_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura..

[b] Estimado por S/N = 3.

Foi verificada a possibilidade de separação de carboidratos por MEKC, mas, conforme demonstra a figura 3.4, tanto a resposta como a separação são deficientes.

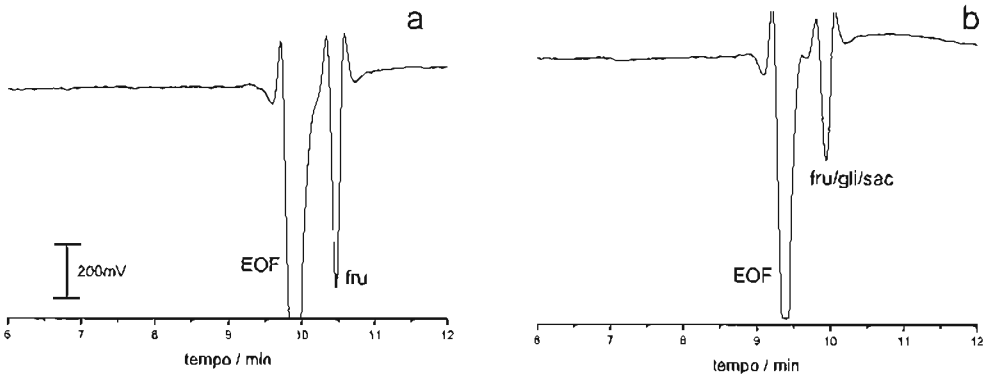


Figura 3.4. Eletroferogramas obtidos com: capilar 3, injeção hidrodinâmica, 30 s, 100 mm. Eletrólito de corrida: tampão Na_2HPO_4 50 mmol.L^{-1} pH 7,0 e SDS 50 mmol.L^{-1}. Concentração dos analitos: (a) frutose 100 mmol.L^{-1}, (b) frutose, glicose e sacarose, todos 20 mmol.L^{-1}.

Mono e dissacarídeos são espécies extremamente hidrofílicas, o que sugere que a baixa resolução e o pequeno deslocamento em relação ao EOF devem-se à pequena interação que essas espécies têm com as micelas. A pequena resposta também pode ser explicada pela baixa interação dos carboidratos com as micelas e é compatível com a discussão desenvolvida no capítulo anterior: a resposta observada deve ocorrer praticamente pelas alterações promovidas no meio aquoso, enquanto alterações apenas discretas devem ocorrer com as micelas, diferindo significativamente em relação à resposta observada na detecção de álcoois alifáticos com CCD.

Capítulo 4

Determinação de salbutamol

4.1 Introdução

Os testes envolvendo a separação e detecção do salbutamol (albuterol) conciliam a intenção de expandir a relação de espécies determinadas e fazer uma comparação do desempenho desse modo de detecção em FSCE e MEKC, uma vez que o mesmo pode assumir carga positiva, negativa ou a forma ziteriônica. Esse fármaco possui dois pKas, 9,3 e 10,3. Abaixo de pH 9,3 está predominantemente com carga positiva, enquanto acima de pH 10,3 está predominantemente aniônico [45].

O salbutamol é um agonista adrenérgico do grupo das feniletanolaminas [46]. Em doses terapêuticas atua seletivamente nos adrenoreceptores β_2 da musculatura lisa brônquica com pouca ação sobre os adrenoreceptores β_1 do músculo cardíaco e adrenoreceptores α. O efeito é a dilatação dos brônquios com pouco efeito de aumento da taxa e força do músculo cardíaco. Apesar de mimetizar os efeitos dos adrenoefetores catecolamínicos encontrados no homem (epinefrina e norepinefrina), não apresenta em sua estrutura (figura 4.1) o catecol, o que permite sua administração oral. Catecolaminas são prontamente degradadas no trato gastrointestinal, onde está presente em grandes quantidades a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Essas características permitem o uso do salbutamol no tratamento da asma, principalmente na forma de xaropes.

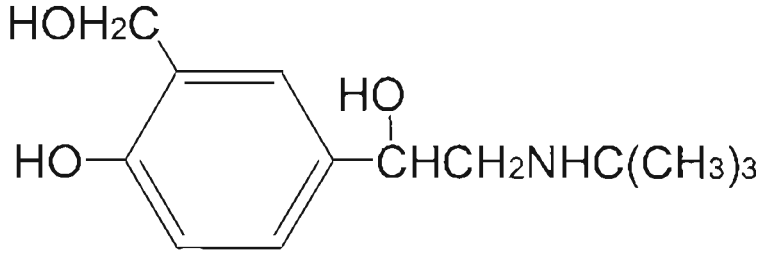


Figura 4.1. Estrutura do salbutamol (albuterol).

4.2 Material e métodos

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As soluções foram preparadas através da dissolução direta desses reagentes ou através da diluição de soluções estoque. Em ambos os casos foi utilizada água deionizada, com resistividade elétrica maior ou igual a 18 MΩ (Nanopure UV, Barnsted). Foi utilizado um capilar de sílica fundida (marca J&W Scientific), 375 μm de d.e. e 50 μm de d.i. com comprimento de 63 cm (54,5 cm da injeção ao detector).

O condicionamento do capilar, assim como o equipamento de CE, estão descritos no capítulo 2.

Foram testados os seguintes eletrólitos para a separação do salbutamol:

- Tampão acetato de potássio 5 mmol L^{-1} pH 4,9;
- Tampão borato de potássio 5 mmol L^{-1} pH 9,0;
- Tampão fosfato de sódio pH 12,1 (Na_2HPO_4 4,5 mmol L^{-1}, NaOH 10 mmol L^{-1}), mais CTAB 0,2 mmol L^{-1};
- Tampão borato de sódio 30 mmol L^{-1} pH 9,4 mais SDS 50 mmol L^{-1}.

As soluções foram preparadas conforme explicado no capítulo 2 e capítulo 3 (tampão pH 12,1).

Todas as injeções foram realizadas de forma hidrodinâmica, por elevação do reservatório da amostra: 25 s, por 100 mm, nos experimentos em FSCE e 30 s por100 mm em MEKC. A injeção da amostra foi realizada no ânodo (polaridade positiva), com exceção da separação realizada com o eletrólito pH 12,1, onde a amostra foi introduzida no cátodo (polaridade negativa).

Por apresentar hidroxilas complexáveis com borato, esse sistema foi nosso ponto de partida para os estudos envolvendo a detecção do salbutamol. Em tampão borato pH 9,0 verificamos que a mobilidade aparente da espécie é muito próxima da mobilidade do EOF, o que indica que nessas condições a carga líquida da espécie é praticamente nula (está na forma ziteriônica, próxima ao ponto isoelétrico). A figura 4.2 mostra um eletroferograma obtido nessas condições e com o uso de tetraetilamônio (TEA) como padrão interno. Como se observa, ocorre uma coeluição com o EOF, o que inviabiliza o uso desse eletrólito para determinação desse composto.

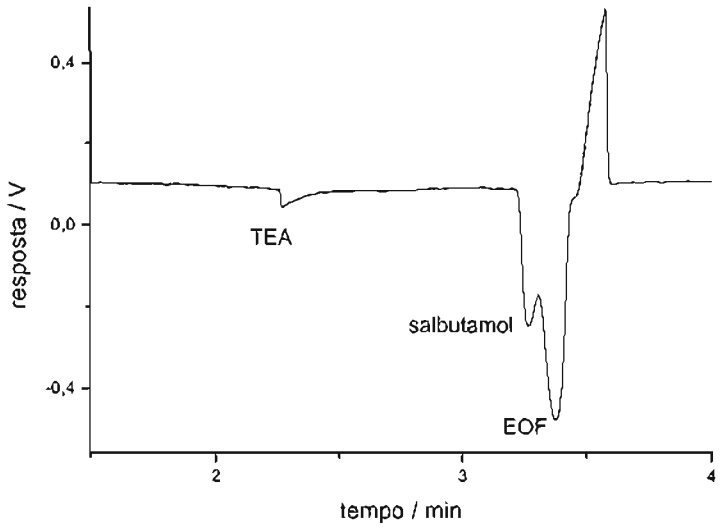


Figura 4.2. Eletroferograma obtido com eletrólito tampão borato de potássio 5 mmol L^{-1}, pH 9,0. Concentração das espécies: 300 μmol L^{-1}. Potencial aplicado, 25 kV (i = 2,4 μA).

Por conferir uma condição de neutralidade, o tampão borato foi escolhido para compor o eletrólito para a separação de salbutamol por MEKC. Como estudos anteriores envolvendo a detecção de álcoois (capítulo 2) indicam que tampões mais concentrados levam a uma SNR maior, o tampão borato foi utilizado em uma concentração mais elevada em relação ao experimento realizado em FSCE. A figura 4.3 mostra um registro típico das separações obtidas por MEKC.

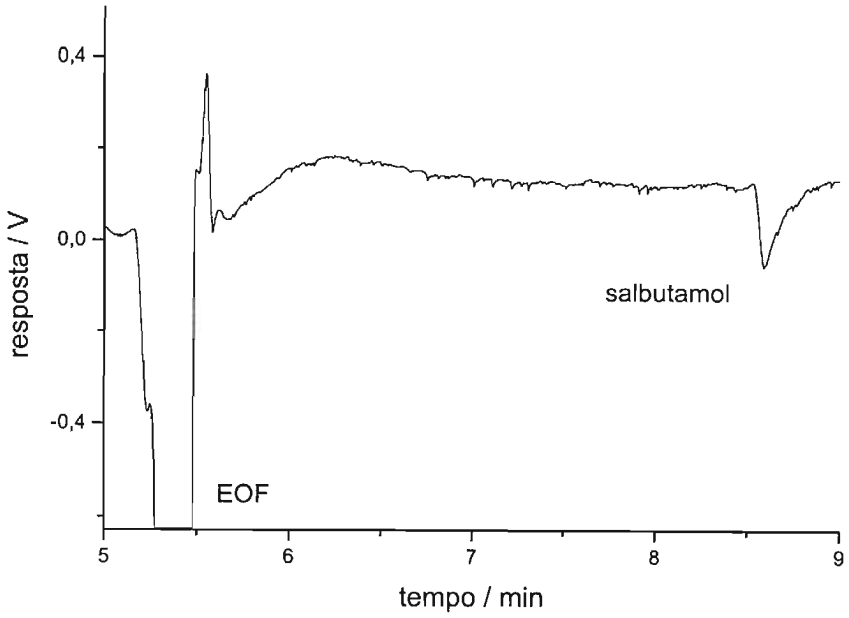


Figura 4.3. Eletroferograma obtido com eletrólito tampão borato de sódio 30 mmol L^{-1} pH 9,4 mais SDS 50 mmol L^{-1}. A concentração de salbutamol é 300 μmol L^{-1}. Potencial aplicado, 15 kV (i = 16,3 μA).

Devido a maior condutividade do eletrólito o potencial de separação teve de ser significativamente reduzido. Uma conseqüência imediata foi o aumento no tempo de corrida.

Foram efetuadas separações do salbutamol dissociado em tampão acetato de potássio pH 4,9, onde o salbutamol apresenta carga positiva. O potássio foi escolhido como contra-íon do tampão acetato por apresentar maior mobilidade em relação ao sódio, o que garante uma maior sensibilidade na detecção condutométrica indireta de cátions. A figura 4.4 apresenta um eletroferograma obtido com tampão acetato e TEA^+ como padrão interno.

Em tampão acetato de potássio, o formato dos picos de TEA^+ e de salbutamol demonstram que possuem uma mobilidade menor que o co-íon do tampão (*tailing peaks*), o que não prejudica a quantificação. Verificou-se que no intervalo testado (50 μmol L^{-1} a 300 μmol L^{-1}) a resposta é linear.

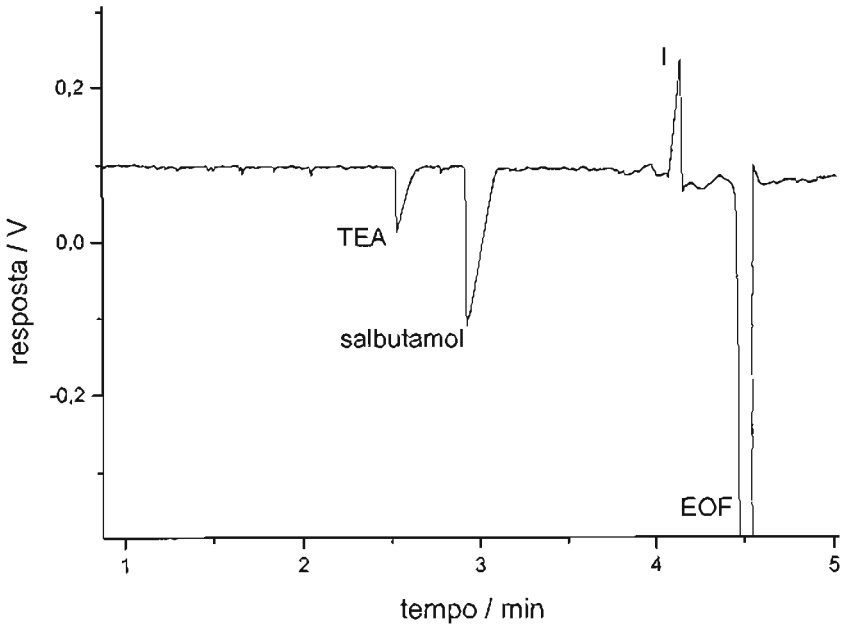


Figura 4.4. Eletroferograma obtido com eletrólito tampão acetato de potássio 5 mmol L^{-1} pH 4,9. Concentração das espécies: Salbutamol 300 μ mmol L^{-1}, TEA^+ 300 μmol L^{-1}. Potencial aplicado, 25 kV (i = 3 μA). Observa-se um pico (I) não identificado.

A detecção de salbutamol como cátion também foi conseguida. Foi utilizado um tampão fosfato de sódio pH 12,1, eletrólito escolhido por estar dentro da faixa de pH desejada e também pelos bons resultados e conhecimento do seu comportamento na detecção condutométrica de açúcares (capítulo 3).

O contraíon escolhido para a composição do tampão foi o sódio. Nesse caso a sensibilidade é determinada pelas diferenças de mobilidade entre as espécies aniônicas do eletrólito (HPO_4^{2-}, PO_4^{3-} e OH^-) e o analito, conforme discutido no capítulo anterior.

Normalmente o sulfato de salbutamol é a forma utilizada para a fabricação de xaropes. Uma característica interessante da determinação de salbutamol como ânion é a possibilidade de determinação simultânea do sulfato. Além do sulfato de salbutamol seria possível a determinação dos açúcares no mesmo xarope, bastando apenas a adequação da diluição para a determinação de cada um dos analitos. A figura 4.5 mostra um

eletroferograma nessas condições, onde se observam os picos correspondentes ao sulfato, ao salbutamol e a galactose, adicionada como padrão interno. No mesmo eletroferograma observamos detecção direta (sulfato) e indireta (salbutamol e galactose).

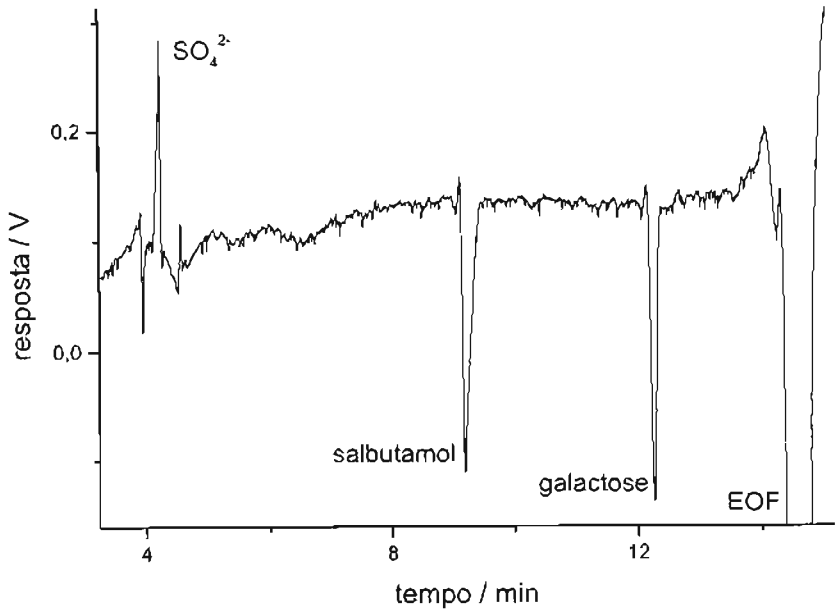


Figura 4.5. Eletroferograma obtido com eletrólito tampão fosfato de sódio 4,5 mmol L^{-1}, NaOH 10 mmol L^{-1}, CTAB 0,4 mmol L^{-1}. Concentração das espécies: Salbutamol 250 μmol L^{-1}, galactose 500 μmol L^{-1}, sulfato 500 μmol L^{-1}. A concentração do sulfato é resultante do sulfato correspondente ao contraíon do salbutamol e a adição de mais 250 μmol L^{-1}. Potencial aplicado, 12 kV (i = 13,3 μA).

Os melhores resultados na determinação de salbutamol foram obtidos em FSCE. A tabela 4.1 demonstra, através do tempo de análise e sensibilidade, a superioridade desse modo frente a MEKC para esse analito.

Tabela 4.1. comparação entre métodos na detecção de salbutamol.

Eletrólito	Modo	Tempo de análise[a]	Sinal/ruído
Ac^-/HAc	FSCE	2,93	220,5
$HPO_4^{2-}/PO_4^{3-}/CTAB$	FSCE	12,30	249,5
$H_3BO_3/B(OH)_4^-/SDS$	MEKC	9,08	34,2

(a) Utilizado o tempo de migração do analito ou do padrão interno, o que for maior.

Cada um dos eletrólitos para separação em FSCE tem suas vantagens. Apesar de apresentar uma SNR maior, o tempo de análise em pH elevado requer um tempo maior de análise, porém em uma mesma injeção pode-se determinar a quantidade de sulfato presente na amostra. Cabe lembrar que existe ainda a possibilidade de utilização de um capilar de 20 μm, de maneira similar ao proposta para a determinação de carboidratos, o que poderia tornar o tempo de análise para o tampão fosfato pH 12 semelhante ao tempo obtido com o tampão acetato, porém uma perda de sensibilidade certamente seria observada com a redução da cela condutométrica.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas

5.1 Conclusões e perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram reforçar a aplicabilidade da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato na análise de compostos não-iônicos. Neste caso, estamos considerando um conceito mais amplo e flexível sobre o que podemos entender como compostos não-iônicos, isto é, substâncias que em condições prévias à introdução no capilar podem comumente ser encontradas em uma forma neutra. Este conceito nos parece mais adequado posto que, durante o processo de separação por FSCE e MEKC, todas as espécies efetivamente separadas estão envolvidas em estruturas eletricamente carregadas. Isso inclui geração de espécies protonadas, desprotonadas, complexos iônicos e, porque não, agregadas a micelas iônicas. Por essa óptica, FSCE e MEKC não se constituiriam em técnicas significativamente distintas – eletroforese e cromatografia –, mas difeririam apenas na estratégia utilizada para se obter espécies iônicas com mobilidades diferenciadas.

Os estudos sobre o mecanismo de detecção em MEKC demonstraram que sistemas micelares são bastante complexos quando são particularmente aplicados à eletroforese. Classicamente, tem-se postulado que a separação ocorra por um processo meramente de partição – análogo à cromatografia – e que a detecção indireta esteja baseada no deslocamento de cromóforos ou fluoróforos ou em alterações locais de outra propriedade, como a condutividade da solução. De fato, tais fenômenos devem ocorrer, mas têm sido desprezados os efeitos dos analitos sobre o grau de dissociação e ionização das micelas, o que levaria a alterações significativas na mobilidade das micelas e contra-íons. Aparentemente, estas alterações levariam a deslocamentos regionais das espécies envolvidas, gerando vacâncias que seriam, então, detectadas.

Foi possível demonstrar que, para as espécies consideradas neste estudo (álcoois alifáticos, açúcares e salbutamol), os métodos desenvolvidos permitem a determinação quantitativa das mesmas em amostras de interesse prático. Para os álcoois, a estratégia apropriada seria MEKC. Já para os açúcares e para o salbutamol, FSCE demonstrou ser mais apropriada tanto em termos de resolução, quanto em termos de sensibilidade. No caso do salbutamol, que pôde ser avaliado como espécie catiônica, neutra e aniônica, esta última parece ser de maior interesse prático, quando for desejável a quantificação do contra-íon encontrado na formulação do fármaco, isto é, o sulfato, e até mesmo a sacarose utilizada como excipiente, observando-se as diluições necessárias.

A pouca adequação de MEKC para açúcares e salbutamol pode ser compreendida, considerando que a estrutura dessas substâncias, apesar de apresentarem cadeias carbônicas de tamanhos significativos, possui grupos funcionais polares ou mesmo iônicos ao longo das mesmas. Desta forma, a interação com a fase micelar se dá em menor extensão que aquela observada para os álcoois.

Como perspectiva de estudos futuros, consideramos importante a continuidade das pesquisas sobre o processo de detecção em MEKC, que na verdade permitiria uma maior compreensão do processo de separação em sistemas micelares. Isso levaria a uma otimização do esforço empenhado na escolha das condições de separação e detecção durante o desenvolvimento de novos métodos de análise.

V. Bibliografia

1.Tiselius, A., "*The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins*", Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, **1930.**

2. Hjérten, S. *Chromatogr. Rev.*, **1967**, 9, 122-219.

3. Hjérten, S. *J. Chromatogr.* **1983**, 270, 1-6.

4. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M. *J. Chromatogr.*, **1979**, 169, 1-10.

5. Jorgenson, J. W.; Lukacs K. D. *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1298-1302.

6. Jorgenson, J. W.; Lukacs K. D. *Science,* **1983**, 222, 266-272.

7. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. "*Electrochemical Methods*", John Wiley & Sons Inc. **1980**.

8. Heiger, D. N. *"High Performance Capillary Electrophoresis",* Hewlett Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E, **1997**.

9. Terabe, S.; Otsuda, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111-113.

10. Terabe, S.; Otsuda, K.; Ando, T. *Anal. Chem.*, **1985,** 57, 834-841.

11. Tavares, M. F. M. *Química Nova,* **1997** 20(5), 493-511.

12. Grossman, P. D.; Colburn. J. C. "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice", Academic Press Inc., San Diego, California.

13. Huang, X.; Pang, T. J.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 2747-2749.

14. Huang, X.; Zare, R. N.; Sloss, S.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.*, **1991,** 63, 189-192.

15. Huang, X.; Zare, R. N. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2193-2196.

16. Fracassi da Silva, J. A. *"Detecção Condutométrica sem Contato (Oscilométrica) para Eletroforese Capilar de Zona e Cromatografia Micelar Eletrocinética"*, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, **2001**.

17. Silva, J. A. F.; Lago, C. L. *Electrophoresis,* **2000**, 21, 1405-1408.

18. da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L. *Anal. Chem.*, **1998**, *70 (20)*, 4339-4343.

19. da Silva, J. A. F.; Guzman, N.; do Lago, C. L. *J. Chromatogr. A,* **2002**, *942*, 249-258.

20. Rocha, F. R.; Gutz, I. R. G.; do Lago, C. L. *Journal of Chemical Education*, **1997**, 74, 572-574

21. Wu, Y. C.; Pratt, K. W.; Koch, W. F. *Journal Solution Chemistry,* **1989**, 18, 515.

22. Manabe, M.; Kawamura, H.; Yamashita, A.; Tokunaga, S. *Journal of Colloid and Interface Sience*, **1987**, 115 (1), 147-154.

23. Zana, R. *Advances in Colloid and Interface Science,* **1995**, 57, 1-64.

24. Shah, S. S.; Saeed, A.; Sharif, Q. M. *Colloids and Interface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1999**, 155, 405-412.

25. Hoiland, H.; Ljosland, E.; Backulund, S. *Journal of Colloid and Interface Sience*, 1984, 102, 2467-471.

26. Amankwa, L. N.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.*, **1991**, *63 (17)*, 1733-1737.

27. Kaneta, T.; Imasaka, T. *Anal. Chem.*, **1995**, *67 (5)*, 829-834.

28. Morin, C. L.; Mofaddel, N. L.; Desbène, A. M.; Desbène, P. L. *J. Chromatogr. A,* **2000**, *872*, 247-258.

29. Howells, J. S.; Altria, K. D. *J. Chromatogr. A,* **1995**, *696*, 341-348.

30. Honda, S., Iwase, S., Makino, A., Fujiwara, S., *Anal. Biochem.* 1989, *176*, 72-77.

31. Honda, S., Makino, A., Suzuki, S., Kakehi, K., *Anal. Biochem.* 1990, *191*, 228-234.

32. Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K., Nakamura, J., *Anal. Biochem.* 1989, *180*, 351-357.

33. Nashabeh, W., El Rassi, Z., *J. Chromatogr.* 1990, *514,* 57-64.

34. Nashabeh, W., El Rassi, Z., *J. Chromatogr.* 1991, *536*, 31-42.

35. Lees, E. M., Weigel, H., *J. Chromatogr.* 1964, *16*, 360-364.

36. Colón, L. A., Dadoo, R., Zare, R. N

37. Honda, S., Suzuki, S., Nose, A., Yamamoto, K., Kakehi, K., *Carbohydr. Res.* 1991, *215,* 193-198.

38. Honda, S., Yamamoto, K., Suzuki, S., Ueda, M., Kakehi, K., *J. Chromatogr.* 1991, *588*, 327-333.

39. Zemann, A., Nguyen, D. T., Bonn, G., *Electrophoresis* 1997, *18*, 1142-1147.

40. Hoffstetter-Kuhn, S., S. Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1991, *63* 1541-1547.

41. Auriota, S., Thibault, P., Sadovskaya, I., Altman, E., *Electrophoresis* 1998, *19*, 2665-2676.

42. Swinney, K., Pennington, J., Bornhop, D. J., *Analyst* 1999, *124 (3)*, 221-225.

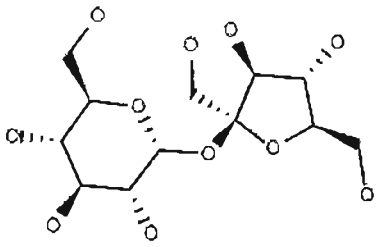
43. Soga, T., Heiger, D. N., *Anal. Biochem.* 1998, *261*, 73-78.

44. Soga, T., Ross, G. A., *J. Chromatogr. A* 1999, *837*, 231-239.

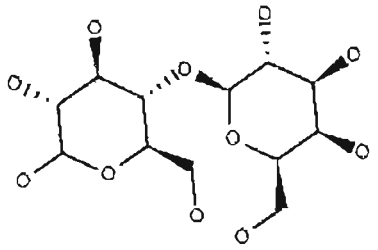
45. Malkki-Laine, L.;Hartikainen, E. *Journal of Chromatogr. A* **1996**, 724, 297-306.

46. Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A. *"Principles of Medical Chemistry"*, 4th, Chapter 18, Williams & Wilkins, Philadelphia.

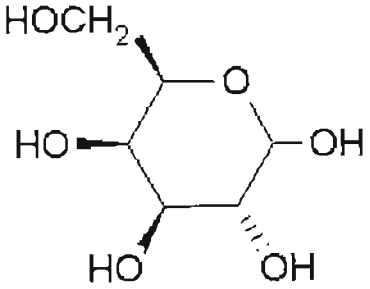
Estrutura, peso molecular e pKa dos carboidratos utilizados no trabalho.



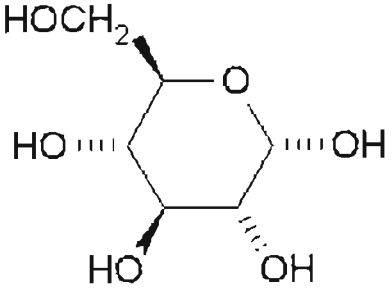
Sacarose, PM 342,3, pKa 12,51



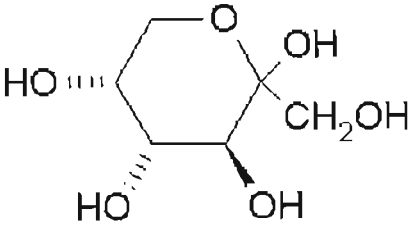
Lactose, PM 342,3, pKa 11,98



D-(+)-galactose, PM 180,2, pKa 12,35



D-(+)-glicose, PM 180,2, pKa 12,35



D-(-)-frutose, PM 180,2, pKa 12,03

VII. *Curriculum Vitae*

Dados pessoais

Nome: Alexandre Zatkovskis Carvalho

Local de nascimento: Osasco – São Paulo - Brasil

Data de nascimento: 24/08/1973

Escolaridade

1988 a 1990 – Escola de 2º Grau Fundação Bradesco

Curso: Técnico em eletrônica

1995 a 2000 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

Curso: Farmácia – Bioquímica, modalidade alimentos

2001 a 2003 – Instituto de Química – Universidade de São Paulo

Curso: Mestrado em Química Analítica

Experiência profissional

10/1989 a 01/1996 – Banco Bradesco S.A.

02/1996 a 08/1997 – Fundação Butantan

09/1997 a 02/1998 – Instituto de Química, Depto. de Bioquímica – Universidade de São Paulo

03/1998 a 03/2001 – Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S.A.

04/2003 – Biolab Sanus Indústria Farmacêutica LTDA.

Participação em reuniões científicas

(1) "Estudo dos Parâmetros Envolvidos na Detecção Oscilométrica de Álcoois em Eletroforese Capilar", Alexandre Z. Carvalho, Carlos A. Neves, Claudimir Lucio do Lago, *11º Encontro Nacional de Química Analítica*, 2001, Campinas, SP.

Artigos publicados

(1) J. A. Fracassi da Silva, N. L. Ricelli, A. Z. Carvalho, C. L. do Lago. *"Improved Separations of IA and IIA Metal Cations in Matrices with High Sodium Concentration by Capillary Electrophoresis with Contacless Conductometric Detection"*, ***Journal of Brazilian Chemical Society***, **2003**, 14, 265-268. J. A. Fracassi da Silva, N. L. Ricelli, A. Z. Carvalho, C. L. do Lago.

(2) A. Z. Carvalho, J. A. Fracassi da Silva, C. L. do Lago. *"Determination of Mono- and Disaccharides by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductometric Detection"*, ***Electrophoresis***, **2003**, 24, 2138-2143.